



MARIA CRISTINA ANTÃO DOS SANTOS CARVALHO

Estudo da qualidade microbiológica de águas balneares
no Norte de Portugal:

Resistência aos β -lactâmicos em isolados gram negativo,
indicadores de contaminação fecal

Dissertação do 2º Ciclo de Estudos Conducente ao grau de Mestre em
Controlo de Qualidade

Trabalho realizado sob orientação da Professora Doutora Helena Maria Neto
Ferreira de Sousa

Julho 2011

É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO INTEGRAL DESTA DISSERTAÇÃO / TESE APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE.

The history of medicine

2001 BC	Here, eat this root.
1000 AD	That root is heathen. Here, say this prayer.
1850 AD	That prayer is superstition. Here, drink this potion.
1920 AD	That potion is snake oil. Here, swallow this pill.
1945 AD	That pill is ineffective. Here, take this penicillin.
1955 AD	Oops . . . bugs mutated. Here, take this tetracycline.
1960–1999 AD	39 more “oops” . . . Here, take this more powerful antibiotic.
2000 AD	The bugs have won! Here, eat this root.

ANONYMOUS

AGRADECIMENTOS

Nesta recta final de Mestrado em Controlo de Qualidade, gostaria de agradecer em primeiro lugar à Professora Doutora Helena Neto Ferreira, pela paciência e compreensão ao longo de todo o mestrado, bem como pelas conversas esclarecedoras ao longo do trabalho.

Agradeço também ao laboratório Equilibrium, pela cedência do laboratório e de material necessário à realização deste trabalho, e às minhas colegas de trabalho por todas as horas em que tive me ausentar para trabalhar na tese.

Por fim, agradeço a todos os que me perguntaram ao longo deste ano “Então, como está a correr a escrita?”.

Dedico este trabalho de Mestrado à minha família, Mãe, Pai, irmãs Leonor e Bárbara, por todo o auxílio e compreensão neste longo percurso de escrita.

RESUMO

O isolamento de bactérias indicadoras de contaminação fecal, como *Escherichia coli* e Enterococos, com resistências a antibacterianos, tem sido verificado em vários nichos ecológicos como águas superficiais e subterrâneas, águas balneares costeiras e interiores, águas residuais domésticas e hospitalares, bem como em águas residuais e em solos de produções animais e agrícolas.

Os antibióticos administrados aos humanos ou animais são parcialmente metabolizados, pelo que se torna de grande importância o estudo e o tratamento das águas residuais, e o controlo do seu aparecimento no meio ambiente, bem como das bactérias resistentes aos antibióticos seleccionados no ambiente intestinal.

Tanto as águas residuais domésticas, como as hospitalares, passam por tratamentos específicos antes de chegarem ao seu destino final, o mar, não estando contemplada a eliminação específica da presença de antibióticos e bactérias resistentes. A presença de antibióticos nos solos pode dever-se à utilização das fezes de animais, oriundas de produções animais, como adubo dos terrenos agrícolas, sendo depositados à superfície, podendo atingir eventuais linhas freáticas, contaminando águas subterrâneas.

No presente estudo foram recolhidas e analisadas 756 amostras de águas provenientes de 79 praias, relativas aos concelhos de Caminha, Viana do Castelo, Esposende, Póvoa do Varzim, Vila do Conde, Matosinhos, Porto, Vila Nova de Gaia e Espinho. Nestas amostras foi possível obter 538 isolados fermentadores de lactose, a partir de meio selectivo com antibiótico, sendo analisado o perfil de susceptibilidade em 42 isolados.

Assim, procedeu-se à monitorização das águas balneares costeiras do Norte de Portugal, pelo isolamento de bactérias indicadoras de contaminação fecal, bem como na água interior, o Rio Ave, que foi identificado como principal fonte de contaminação da área balnear marítima. Com o intuito de avaliar a origem da contaminação procedeu-se à análise do solo e fezes de animais da área envolvente, bem como a análise da água do rio Ave, na nascente e em outros pontos antes e na foz do rio.

Também se procedeu à detecção de coliformes com resistências a antibióticos β -lactâmicos, bem como de bactérias produtoras de β -lactamases de espectro alargado, nas praias do litoral norte, desde Caminha até Espinho. Foram obtidos dois isolados de *E.coli* produtores de β -lactamases de espectro alargado, pelo método de

sinergismo. Foi também avaliado o ponto isoelétrico de quatro isolados de *E. coli*, que demonstraram, por focagem isoelétrica, bandas de pI 5,4 e >8.

Foram também submetidos ao processo de conjugação três isolados, dos quais se verificou no isolado AterroATMD1 ocorrência de conjugação, verificando-se no antibiograma sinergismo da cefotaxima com a amoxicilina com o ácido clavulânico e , conseqüentemente a transferência do gene codificador da β -lactamase de espectro alargado.

O problema ecológico da presença de bactérias resistentes, como também dos próprios genes de resistência, tornou-se nas últimas décadas, um grave problema de saúde pública, pelo desconhecimento dos efeitos de concentrações sub-inibitórias dos antibióticos nos ecossistemas, bem como a sua disseminação, levando a cada vez maiores e preocupantes dificuldades no tratamento de infecções tanto humanas como animais.

Este estudo demonstra a existência de contaminação microbiológica no rio Ave, provavelmente pelas produções agrícolas e animais, que poderá relacionar-se com os níveis elevados de bactérias encontrados na foz do rio, afectando toda a zona balnear.

Palavras-chave: águas balneares costeiras, águas balneares interiores, bactérias indicadoras contaminação fecal, resistência a antibióticos β -lactâmicos, β -lactamases de espectro alargado

ABSTRACT

The isolation of fecal indicator bacteria such as *Escherichia coli* and *Enterococcus* with resistance to antibiotics, has been detected in various ecological niches such as surface and ground water, coastal and inland bathing waters, domestic wastewater and hospitals, as well as in agricultural soils and livestock production. Antibiotics administered to humans or animals are partially metabolized, and it is therefore of great importance to the study and treatment of sewage, and control of its occurrence in the environment. Both domestic wastewater, such as hospital, undergo specific treatments before reaching their final destination, the sea, not being contemplated to eliminate the presence of specific antibiotics. Since antibacterial contamination in soils is due to the use of animal feces, derived from animal products such as fertilizer on farmland, being deposited on the surface, but it could reach any existing groundwater, contaminating groundwater.

In the present study were collected and analyzed 756 water samples from 7 beaches on the municipalities of Caminha, Viana do Castelo, Esposende, Póvoa do Varzim, Vila do Conde, Porto, Vila Nova de Gaia and Espinho. In these samples could be obtained 538 isolates of lactose fermenters from selective medium and analyzed for susceptibility profiles in 42 isolates.

In this study we proceeded to the monitoring of coastal bathing waters in northern Portugal, by isolation of indicator bacteria as well as bathing water, Rio Ave, who was identified as the main source of contamination of the area involved. In order to evaluate the source of contamination proceeded to the analysis of soil and animal feces in the surrounding area, as well as analysis of the river Ave in the spring.

It also proceeded with the detection of coliform resistance to β -lactam antibiotics and bacteria β -lactamase-producing extended-spectrum, on the beaches of the north coast, from Caminha to Espinho. We obtained two isolates of *E. coli* β -lactamase-producing extended-spectrum by the method of synergism. It was also rated the isoelectric point of four isolates of *E. coli*, which demonstrated by isoelectric focusing, pI bands of 5.4 and >8.

We subjected to the combined three isolates, of which there AterroATMD1 in the isolated occurrence of conjugation, checking on the antibiotic resistance to cefotaxime.

The ecological problem of the presence of antibiotics in the environment, considers the ecology of resistant bacteria, as well as the resistance genes themselves become in recent decades, a serious public health problem, by ignoring the effects of sub-inhibitory concentrations of antibiotics ecosystems and their spread, leading to increasingly difficult and troubling for the treatment of infections of humans and animals.

This study demonstrates the existence of contamination in the Ave river, due to agricultural crops and animals, can be related with high levels of bacteria found in the mouth of the river, affecting the entire bathing area.

Key words: coastal bathing waters, fecal indicator bacteria, resistance to β -lactam antibiotics, extended-spectrum β -lactamases

ÍNDICE

CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO GERAL	17
1. BIOINDICADORES DE CONTAMINAÇÃO FECAL	18
1.1. <i>ESCHERICHIA COLI</i>	18
1.2. ENTEROCOCOS (<i>ENTEROCOCCUS</i>)	20
2. AGENTES ANTIMICROBIANOS	22
2.1. ASPECTOS GERAIS	22
2.2. PRINCIPAIS GRUPOS DE ANTIBIÓTICOS	23
2.3. ANTIBIÓTICOS ANTIPARIETAIS: BETA-LACTÂMICOS	24
2.4. RESISTÊNCIAS AOS ANTIMICROBIANOS	26
2.5. PRINCIPAIS MECANISMOS DE RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS	28
2.6. BETA-LACTAMASES	30
2.6.1. INIBIDORES DAS BETA-LACTAMASES	35
2.6.2. DETECÇÃO DAS BETA-LACTAMASES	36
3. QUALIDADE DAS ÁGUAS BALNEARES	39
3.1. ÁGUAS BALNEARES COSTEIRAS E INTERIORES	39
4. UTILIZAÇÃO DE ANTIBIÓTICOS EM PRODUÇÃO ANIMAL	42
5. PERSPECTIVA GLOBAL DAS RESISTÊNCIAS	49
CAPÍTULO 2 – OBJECTIVOS	51
2.1. OBJECTIVOS DO TRABALHO	51
CAPÍTULO 3 – MATERIAL E MÉTODOS	52
3.1. ORIGEM DAS AMOSTRAS	52
3.1.1. MÉTODO DE RECOLHA DAS AMOSTRAS	57
3.1.2. METODOLOGIA DE ANÁLISE	59
3.1.2.1. QUANTIFICAÇÃO DE <i>ESCHERICHIA COLI</i> PELA TÉCNICA DA MEMBRANA FILTRANTE, SEGUNDO DECRETO LEI Nº 135/2009, DE 3 DE JUNHO	59
3.1.2.2. QUANTIFICAÇÃO DE ENTEROCOCOS PELA TÉCNICA DA MEMBRANA FILTRANTE, SEGUNDO DECRETO LEI Nº 135/2009, DE 3 DE JUNHO	60

3.1.3. ANÁLISE DE SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIBACTERIANOS DOS ISOLADOS DE GRAM NEGATIVO SELECCIONADOS	60
3.1.4. ANÁLISE MICROBIOLÓGICA EM AMOSTRA DE SOLO	61
3.1.5. ANÁLISE MICROBIOLÓGICA EM AMOSTRAS DE FEZES DE BOVINO	61
3.2. ENSAIOS DE SUSCEPTIBILIDADE A AGENTES ANTIMICROBIANOS	62
3.3. CONSERVAÇÃO DAS ESTIRPES	64
3.4. CARACTERIZAÇÃO DOS ISOLADOS	64
3.4.1. PROVAS BIOQUÍMICAS	64
3.4.2. CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA PELO API 20E	66
3.4.3. TESTE DE SINERGISMO	67
3.4.4. FOCAGEM ISOELÉCTRICA	67
3.4.5. CONJUGAÇÃO	68
3.5. CONTROLO QUALIDADE	69
CAPÍTULO 4 – RESULTADOS	72
4.1. AMOSTRAGEM	73
4.2. ANÁLISE MICROBIOLÓGICA SEGUNDO DECRETO LEI 135/2009, DE 3 DE JUNHO	73
4.3. ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DAS AMOSTRAS DE ÁGUAS DO RIO AVE	85
4.4. ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DA AMOSTRA DE ÁGUA DA SERRA DA CABREIRA	86
4.5. ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DAS AMOSTRAS FEZES DE BOVINO E DO SOLO	86
4.6. ENSAIOS DE SUSCEPTIBILIDADE A AGENTES ANTIMICROBIANOS	87
4.6.1. CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA PELO API 20E	911
4.7. TESTE DE SINERGISMO	91
4.8. FOCAGEM ISOELÉCTRICA	92
4.9. CONJUGAÇÃO	93
CAPÍTULO 5 – DISCUSSÃO	95
CAPÍTULO 6 – CONSIDERAÇÕES FINAIS	99
BIBLIOGRAFIA	101

ÍNDICE FIGURAS

Figura 1. Locais de actuação dos diferentes agentes antimicrobianos	23
Figura 2. Estrutura química dos antibióticos β -lactâmicos	25
Figura 3. Mecanismos de resistência a antibióticos	28
Figura 4. Estrutura química dos inibidores de β -lactamases	36
Figura 5. Resistências (%) à eritromicina em <i>Enterococcus faecium</i> e <i>Enterococcus faecalis</i> isolados de porcos relacionados com o consumo de macrólidos, em toneladas, na Dinamarca	46
Figura 6. Consumo de antimicrobianos em animais de produção na Dinamarca (em toneladas) entre 1990-2006	47
Figura 7. Praias no litoral norte de Portugal, desde o concelho de Caminha, a norte, ao concelho de Espinho	52
Figura 8. Locais de amostragem no Rio Ave e praia da Árvore	56
Figura 9. Material de amostragem	57
Figura 10. Ponto de amostragem de solo, numa produção animal situada na margem do rio Ave, Junqueira	58
Figura 11. Local de amostragem das fezes dos animais, Touguinha	58
Figura 12. Locais de amostragem com crescimento excessivo de jacintos	72
Figura 13. Local de descarga de efluentes ao longo dos campos de pasto, que desaguam no Rio Ave	73
Figura 14. Resultados obtidos na quantificação de <i>E.coli</i> , em amostras de águas balneares, no concelho de Caminha	74
Figura 15. Resultados obtidos na quantificação de <i>E.coli</i> , em amostras de águas balneares, no concelho de Viana do Castelo	74
Figura 16. Resultados obtidos na quantificação de <i>E.coli</i> , em amostras de águas balneares, no concelho de Esposende	75
Figura 17. Resultados obtidos na quantificação de <i>E.coli</i> , em amostras de águas balneares, no concelho da Póvoa do Varzim	76
Figura 18. Resultados obtidos na quantificação de <i>E.coli</i> , em amostras de águas balneares, no concelho de Vila do Conde	76
Figura 19. Resultados obtidos na quantificação de <i>E.coli</i> , em amostras de águas balneares, no concelho de Matosinhos	77
Figura 20. Resultados obtidos na quantificação de <i>E.coli</i> , em amostras de águas balneares, no concelho do Porto	77
Figura 21. Resultados obtidos na quantificação de <i>E.coli</i> , em amostras de águas balneares, no concelho de Vila Nova de Gaia	78
Figura 22. Resultados obtidos na quantificação de <i>E.coli</i> , em amostras de águas balneares, no concelho de Espinho	78

Figura 23. Resultados obtidos na quantificação de <i>Enterococos</i> , em amostras de águas balneares, no concelho de Caminha	79
Figura 24. Resultados obtidos na quantificação de <i>Enterococos</i> , em amostras de águas balneares, no concelho de Viana do Castelo	80
Figura 25. Resultados obtidos na quantificação de <i>Enterococos</i> , em amostras de águas balneares, no concelho de Esposende	80
Figura 26. Resultados obtidos na quantificação de <i>Enterococos</i> , em amostras de águas balneares, no concelho da Póvoa do Varzim	81
Figura 27. Resultados obtidos na quantificação de <i>Enterococos</i> , em amostras de águas balneares, no concelho de Vila do Conde	81
Figura 28. Resultados obtidos na quantificação de <i>Enterococos</i> , em amostras de águas balneares, no concelho de Matosinhos	82
Figura 29. Resultados obtidos na quantificação de <i>Enterococos</i> , em amostras de águas balneares, no concelho do Porto	82
Figura 30. Resultados obtidos na quantificação de <i>Enterococos</i> , em amostras de águas balneares, no concelho de Vila Nova de Gaia	83
Figura 31. Resultados obtidos na quantificação de <i>Enterococos</i> , em amostras de águas balneares, no concelho de Espinho	83
Figura 32. Qualidade das águas balneares nas praias, relacionadas com os concelhos, para o parâmetro <i>E. coli</i> , em percentagem	84
Figura 33. Qualidade das águas balneares nas praias, relacionadas com os concelhos, para o parâmetro <i>Enterococos</i> , em percentagem	85
Figura 34. Contagens obtidas nas águas recolhidas no rio Ave, nos pontos de amostragem, Árvore, marina de Vila de Conde, Touguinha e Junqueira, para o parâmetro <i>E. coli</i> , no meio de cultura McConkey suplementado com antibiótico (MER, CTX, ATM)	85
Figura 35. Perfil de susceptibilidade aos diferentes antibióticos das estirpes isoladas, obtidas neste estudo, em percentagem	88
Figura 36. Antibiógramas obtidos pelo isolamento de bactérias a partir das amostras de água de mar	90
Figura 37. Resultados do teste de sinergismo	92
Figura 38. Gel resultante da focagem isoeléctrica	92
Figura 39. Antibiógrama obtido do transconjugante AterroATMD1 1i e <i>E. coli</i> K802N	94

ÍNDICE TABELAS

Tabela 1. Sistema de classificação de β -lactamases por Bush-Medeiros-Jacoby, 1995	33
Tabela 2. Métodos de detecção genotípica das β -lactamases	38
Tabela 3. Valores padrão e classificação para as águas balneares costeiras e de transição	39
Tabela 4. Valores padrão e classificação para as águas balneares interiores	40
Tabela 5-A. Estimativa do consumo de agentes antimicrobianos, em Kg, pela prescrição destes em produção animal, no período de 1990 a 2000, Dinamarca	42
Tabela 5-B. Consumo de agentes antimicrobianos em bovinos em Doses Diárias (ADDs- massa em Kg de animais tratados, medida pelo peso corporal dos animais)	48
Tabela 6. Localização dos concelhos e das praias amostradas	53
Tabela 7. Distribuição da colheita das praias durante a época balnear	53
Tabela 8. Denominação das semanas de amostragem	54
Tabela 9. Amostras filtradas para meios com antibiótico, por locais e semana	54
Tabela 9B. Amostras filtradas para meios com antibiótico, por locais e semana	55
Tabela 10. Antibióticos utilizados e critérios de avaliação de acordo com Clinical Laboratory Standarts Institute (Clinical and Laboratory Standards Institute 2009), pela metodologia de difusão de discos	63
Tabela 11. Controlo de qualidade associado aos meios de cultura utilizados nos ensaios	69
Tabela 12. Estirpes utilizadas no Controlo de Qualidade, de acordo com as características dos meios de cultura	70
Tabela 13. Quantificação do crescimento de bactérias coliformes em meio McConkey suplementado com ATM, CTX e MER	87
Tabela 14. Perfil de susceptibilidade dos isolados de interesse de <i>E. coli</i> e ponto isoeléctrico das respectivas β -lactamases	89
Tabela 15. Resultados do teste sinergismo	91
Tabela 16. Perfis de susceptibilidade dos transconjugantes, AterroATMD1 1i e AterroATMD1 2i	93

LISTA ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AMC – Amoxicilina + Ácido clavulânico

AMP – Ampicilina

ATM – Aztreonam

BEA – Bilis Esculina Azida Agar

BHI – Brain Heart Infusion

ESBL's – Extended Spectrum Beta Lactamase

CAZ – Ceftazidima

CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute

CMI – Concentração mínima inibitória

CTX – Cefotaxima

CTX-M – Activa para Cefotaxima, documentada pela primeira vez em Munique

CXM – Cefuroxima

DNA – Ácido desoxiribonucleico

FDA – “Food and Drugs Administration”

FEP – Cefepima

FOX – Cefotaxima

I – Resistência Intermédia

IMP – Imipenemo

ISO – International Standard Organization

MC – McConkey

MH – Mueller-Hinton

MR-VP – Methyl Red-Voges Proskauer

N.D. – Não detectado

NA – Ácido nalidíxico

PBP – Proteína de ligação à penicilina (“Penicillin-Binding-Protein”)

R – Resistência

RNA – Ácido ribonucleico (“Ribonucleic Acid”)

S – Sensível

SBA – Slanetz-Bartley Agar

Si – Sinergismo

TSB – Trypticase Soy Broth

UE – União Europeia

UFC – Unidades formadoras de colónias

WHO – “World Health Organization”

CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO GERAL

A crescente emergência de *Enterobacteriaceae* resistentes a antimicrobianos representa um risco sério para a Saúde Pública.

A questão da resistência aos antimicrobianos compreende tanto a medicina humana, veterinária e o meio ambiente. Isto exige uma interdisciplinaridade e compreensão adequada da relação íntima entre os animais e o Homem, pela importância da cadeia alimentar neste processo, bem como as relações com os seus ecossistemas.

A presença de microrganismos resistentes a antibióticos em ambiente aquático é consequência de descargas de águas residuais sem tratamento (Goñi-Urriza 2000), do uso indiscriminado de antibióticos na medicina humana e animal, como em práticas agrícolas (Munir 2011) e a descarga de metais pesados, poluindo quimicamente as águas (Stepanauskas 2005).

Um dos mecanismos de resistência mais importantes é a produção de β -lactamases e a diminuição de sensibilidade aos oximino- β -lactâmicos antibacterianos provocada por estas enzimas de espectro alargado (ESBL's).

Como medida de combate ao aumento das resistências antimicrobianas, surgiu a necessidade de realizar uma vigilância e avaliação da susceptibilidade de bactérias presentes nos humanos, animais e meio ambiente, aos diversos antibióticos (WHO, 2011). Assim, uma constante monitorização de estirpes indicadoras de resistências vai permitir comparar as resistências nos diferentes ecossistemas, avaliando o efeito da pressão selectiva exercida pelo uso de antibióticos. Estas estirpes são consideradas indicadores de resistências bacterianas pelo seu aparecimento numa grande diversidade de nichos ecológicos. A identificação da origem dos genes codificadores de resistências nas populações microbianas é essencial para a definição de modelos eficazes para a avaliação da situação a nível mundial e a criação de medidas sustentáveis para o seu controlo (Baquero 2008). Este aumento de resistências bacterianas, devido à poluição de origem fecal em águas superficiais naturais, constitui

não só um sério problema de saúde pública, como se torna essencial a investigação destas resistências em ambientes não hospitalares (Alcaide 1984; Baquero 2008).

1. BIOINDICADORES DE CONTAMINAÇÃO FECAL

Sendo *E.coli* e *Enterococcus* spp. comensais da flora gastrointestinal dos humanos e da maioria dos animais, são consideradas bactérias indicadoras. O estudo da sua ocorrência e disseminação no meio ambiente é um ponto crítico para a avaliação da susceptibilidade destas aos antibióticos, e dos fenómenos de resistência existentes.

1.1. *ESCHERICHIA COLI*

A espécie *Escherichia coli* pertence à família das *Enterobacteriaceae*, tratando-se de bactérias de reacção Gram negativa, estruturalmente com forma de bastonete pleomorfo, não esporuladas e normalmente móveis com flagelos peritricos. Também pode observar-se os *pili* que são organelos de adesão, que também podem permitir a transferência de DNA durante a conjugação bacteriana (Neidhardt 1990). Em determinadas condições pode observar-se uma cápsula, camada externa de polímeros polissacáridos, importante na protecção destes microrganismos em condições ambientais adversas e na adesão a superfícies.

Bioquimicamente são microrganismos oxidase negativos, catalase positiva, que fermentam a glucose e lactose. A maioria das bactérias desta estirpe cresce facilmente em laboratório, nos meios usuais, considerando-se também uma espécie anaeróbia facultativa e com metabolismo fermentativo ou oxidativo.

Predominante no sistema gastrointestinal do Homem e em diversos animais, foi identificada pela primeira vez em 1885 pelo pediatra alemão Theodor Escherich que a designou inicialmente como *bacterium coli commune* (Holms 1996; Martinez-Antonio and Collado-Vides 2003).

A maioria das estirpes de *E. coli* é comensal e sintetizam a vitamina K e B12. Colonizam o intestino humano e encontram-se em concentrações nas fezes, aproximadamente 10⁶ a 10⁹ UFC/grama de fezes (Slutsker 1997).

Nos animais, o tracto digestivo logo após o nascimento, é colonizado por uma grande variedade de bactérias, cujo número tem tendência a estabilizar durante ou posteriormente à fase de desmame (Buddington 2003).

Caracterizam-se pela sua capacidade rápida de adaptação a alterações do meio ambiente, crescendo e dividindo-se rapidamente. Além de pertencer à flora intestinal pode provocar doenças sérias, entre elas, infecções urinárias, septicemia, diarreia e meningite. Provoca portanto, infecções intestinais e extra intestinais (Bailey 1986; Neidhardt 1990).

A *E. coli* sendo uma bactéria comensal do intestino, com função protectoras contra infecções, simultaneamente com outras bactérias comensais pela competição com outras bactérias patogénicas intestinais como, por exemplo, *Shigella* e *Salmonella* (D'Aoust 1994; Doyle 1997; Skumik 2006).

Embora predominantemente comensal, *E. coli* é responsável por uma grande quantidade de toxinfecções alimentares, infecções extra-intestinais tais como infecções abdominais e do tracto urinário (Guerrant 2001; Costa 2008). Algumas *E.coli* são patogénicas, possuindo diversos factores de virulência e mecanismos de patogenicidade, geralmente associados a síndromes clínicas. Estes factores de virulência não são normalmente encontrados em bactérias comensais (Duriez 2001; Skurnik 2006).

Com base nestas características as espécies de *E. coli* são agrupadas de acordo com os efeitos produzidos e serogrupos distintos. Consideram-se quatro categorias, sendo elas: *E. coli* enteropatogénica (EPEC), *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) e a *E. coli* entero invasiva (EIEC). De referir que as estirpes ETEC e EIEC têm como principal reservatório o Homem (Doyle 1997). As EPEC e ETEC causam essencialmente diarreia severa sendo as ETEC responsáveis pelos serótipos mais frequentemente associados à “diarreia do viajante” como também à diarreia infantil nos países em desenvolvimento (Neill 2001).

Filogeneticamente as estirpes de *E.coli* são quatro, A, B1, B2 e D sendo as mais comuns entre as populações a A e B1, seguindo-se a estirpe D (Clermont 2000; Herzer 1990). O grupo B2 é raramente encontrado.

Foi também nesta espécie que se identificou, pela primeira vez, o processo de conjugação bacteriana, por Joshua Lederberg e Eduard Tatum (Lederberg 1946). Este processo é um mecanismo de transferência horizontal de genes entre bactérias da mesma espécie e espécies diferentes, que induz ou reprime a expressão do gene em causa, de acordo com as condições envolventes. Possibilita assim, a sobrevivência da bactéria, permitindo-lhe evoluir em ambientes com condições

adversas, incluindo a presença de antibióticos. Os plasmídeos conjuntivos são transferidos para as células receptoras como plasmídeos de DNA de cadeia simples (Baharoglu 2010).

Os isolados patogénicos encontrados por Duriez *et al*, são considerados verdadeiros reservatórios genéticos, pelo que, existem diversos estudos para determinar se as diferenças geográficas entre as populações comensais de *E.coli* estão associadas às variações da distribuição geográfica das doenças, provocadas pelas diferentes estirpes *E.coli*. Novos ensaios sobre a sua distribuição geográfica, socioeconómica e dados clínicos recentes, são importantes para o reconhecimento de espécies *E.coli* mutantes virulentas (Duriez 2001).

Estirpes de *E. coli* têm sido isoladas do meio ambiente, quer de águas, animais e produtos alimentares (Jones 1986; Bohnert 2000; Chigor 2010). Esta espécie apresenta diversas resistências a factores ambientais, contaminando a água e alimentos, tornando-se um indicador de contaminação fecal (Guerrant 2001).

1.2. ENTEROCOCOS (*ENTEROCOCCUS*)

O género *Enterococcus* spp. foi inicialmente descrito em 1899, por Thiercellin, que descreveu um diplococo Gram positivo de origem intestinal humana como enterococo (Thiercelin 1899). Estes microrganismos caracterizam-se bioquimicamente, como bactérias Gram positivo, catalase negativo e anaeróbios facultativos. São móveis e produzem pigmento (Klein 2003). As principais espécies do género *Enterococcus* são: *Enterococcus durans*, *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. gallinarum*, *E. hirae*, *E. casseliflavus*, *E. avium*, *E. malodoratus*, *E. mundtii*, *E. raffinosus* e *E. solitarius*, sendo a sua caracterização complexa, devido aos vários mecanismos de resistência que possuem e à constante acumulação de resistências (Facklam 1989 ; Murray 1998).

As espécies *Enterococcus faecalis* e *E. faecium* representam a maioria das espécies de enterococos, sendo isoladas de diferentes origens. *E. raffinosus* foi isolada em águas de piscina e compostagem (Cabral 2010).

Os enterococos encontram-se dispersos pelo ecossistema, água, alimentos e solo, e são capazes de sobreviver a situações adversas, possuindo uma elevada resistência a factores ambientais como variações drásticas de temperatura, concentração de NaCl, pH e produtos químicos, como detergentes (Novais 2005; Macedo 2011). No entanto, as águas ambientais não são o habitat natural dos enterococos, sugerindo contaminações de origem fecal, nas águas onde estes são isolados (Cabral 2010).

Devido a todas estas características, estes microrganismos são considerados patogénicos, sendo necessária e vital a sua monitorização.

2. AGENTES ANTIMICROBIANOS

2.1. ASPECTOS GERAIS

O principal motivo para o início do estudo das propriedades antimicrobianas em produtos naturais e químicos surgiu com a crescente mortalidade nas comunidades, devido a doenças infecciosas (Sousa 2005).

Assim, nos últimos anos o estudo dos antibióticos tornou-se imprescindível, para podermos evoluir em termos terapêuticos, como também compreender as resistências adquiridas por certas bactérias a estes agentes quimioterapêuticos e desta forma, possibilitar um maior controlo das infecções provocadas por microrganismos, sendo que estas estirpes patogénicas podem levar à incapacitação prolongada ou até a morte dos seres humanos (Eisenstein 2003).

Com a evolução da antibioterapia, considerou-se que todas as substâncias químicas, naturais ou sintéticas, que tenham a capacidade de impedir a multiplicação de bactérias ou de as destruir sem ter efeitos tóxicos para o homem ou animal, denominam-se antibióticos (Sousa 2005). Podemos assim definir duas formas de actuação, sendo os antibióticos bacteriostáticos aqueles que têm a finalidade de inibir o crescimento de outros organismos, permitindo que o hospedeiro destrua o patogénico com as suas defesas naturais (Harold 1996), e bactericidas os antibióticos que podem destruir por completo os microrganismos (Prescott 1996).

Os antimicrobianos podem ser utilizados tanto em medicina humana como veterinária, para tratar doenças causadas por bactérias e como também, para prevenção de infecções bacterianas.

Na medicina veterinária, são considerados promotores de crescimento em animais de produção e na medicina humana, como agentes antitumorais (citostáticos) e noutras áreas, como na agricultura, para pesticidas que controlam infecções bacterianas em campos de cultivo, nomeadamente de cereais, e preservação de alimentos. Também podem ser utilizados como ferramentas de estudo em áreas de investigação, como na bioquímica e biologia molecular (Sousa 2005).

É de extrema importância o conhecimento e o estudo dos mecanismos de acção de agentes quimioterápicos específicos, pois esse conhecimento auxilia a explicação da sua natureza e grau de toxicidade individual, e selectiva, bem como a concepção de novos agentes (Prescott 1996).

A presença de microrganismos como *E.coli*, presente na microflora entérica humana, animal, hospitalar e na água, solo e alimentos, permite estudos de monitorização sobre as resistências aos antibióticos usados nas diferentes áreas.

Estes, possibilitam retirar elações acerca do impacto do uso de antimicrobianos nos diferentes nichos ecológicos, como também tirar conclusões para considerações futuras sobre alternativas a usar na sua prevenção e remediação (Sousa 2005).

2.2. PRINCIPAIS GRUPOS DE ANTIBIÓTICOS

Os agentes antimicrobianos vão interferir nos diferentes processos essenciais à célula bacteriana como o crescimento e divisão, sua replicação, e a síntese ou obtenção de biomoléculas para o funcionamento desses mesmos processos básicos (Harold 1996).

Assim, os antibióticos podem ser diferenciados por grupos de acordo com a sua origem, forma de actuação, espectro de acção e alvo na célula bacteriana.

De acordo com os mecanismos de acção, podemos classificar os antibióticos como demonstra a figura 1. Os antibióticos que inibem a síntese proteica: Aminoglicosídeos-aminociclitolis, Tetraciclins e Glicilciclins, Macrólidos, Cloranfenicol; a síntese de ácidos nucleicos: Quinolonas; a ruptura de reacções metabólicas específicas: Sulfonamidas e Trimetoprim; a inibição da síntese e funcionamento de membranas citoplasmáticas: Polimixina; e da parede celular: Antibióticos Antiparietais (Harold 1996; Sousa 2005).

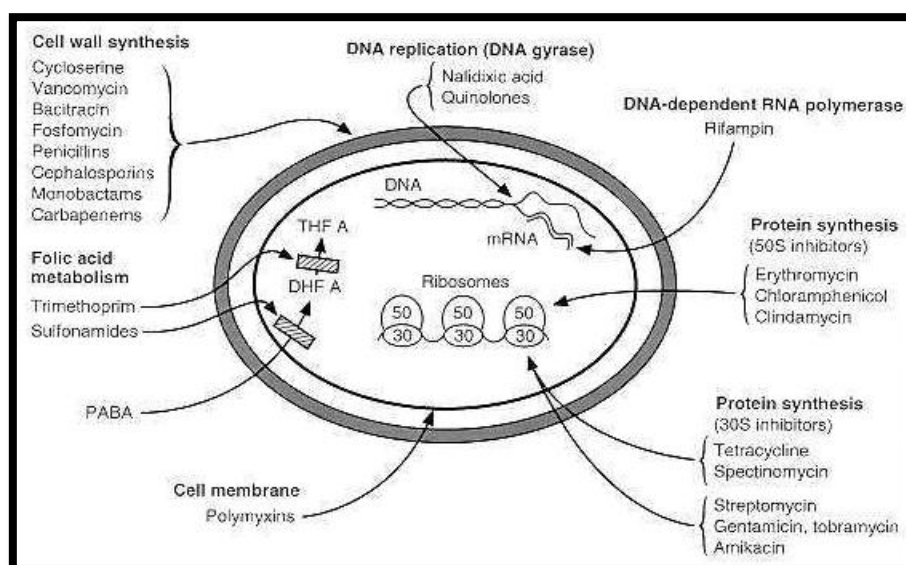


Figura 1. Locais de actuação dos diferentes agentes antimicrobianos. Legenda: PABA (paraminobenzoic acid); DHFA (dihydrofolic acid); THFA (tetrahydrofolic acid). Fonte: (Harold 1996).

2.3. ANTIBIÓTICOS ANTIPARIETAIS: BETA-LACTÂMICOS

Este grupo de antibióticos tem como alvo o peptidoglicano, elemento base da parede celular das bactérias. Considera-se que actuam de modo selectivo, pois se a parede for danificada, principalmente em ambientes hipotónicos, a rigidez da parede celular da bactéria perde-se, levando à lise celular e em consequência, à morte desta (Harold 1996; Livermore 2004) .

O peptidoglicano é composto por dois açúcares aminados, N-acetilglucosamina e ácido N-acetilmurâmico, dispostos em cadeias lineares, e um peptídeo de cinco aminoácidos que termina em D-alanil-D-alanina, ligado ao N-acetilmurâmico. A ligação entre as cadeias é feita pela ligação de pontes interpeptídicas, com os peptídeos da cadeia vizinha, após a remoção da D-alanina terminal de cada peptídeo. Esta transpeptidação é realizada pelas enzimas presentes no folheto externo da membrana celular, as *penicillin-binding-proteins* (PBP's), catalisando a ligação cruzada das subunidades da parede celular (Sousa 1998).

A síntese do peptidoglicano ocorre em três fases, das quais os diferentes agentes antimicrobianos podem actuar.

No citoplasma, na fase inicial, são sintetizados os precursores do processo de baixo peso molecular, onde actuam as fosfomicinas, bloqueando a actuação das enzimas bacterianas e a cicloserina, que compete com as alaninas na ligação enzimática.

A segunda etapa da síntese da parede celular é catalisada por enzimas ligadas à membrana citoplasmática. Nesta etapa intervém a Bacitracina, que impede a posterior transferência das subunidades precursoras do peptidoglicano do interior hidrofóbico da membrana até à superfície, os antibióticos glicopéptidos, a Vancomicina e a Teicoplanina, que inibem as ligações cruzadas da cadeia do peptidoglicano. Por serem moléculas de grandes dimensões, são apenas eficientes contra bactérias gram positivo, pois não conseguem deslocar-se através dos poros da membrana exterior das bactérias gram negativo.

A terceira fase da síntese da parede celular envolve a polimerização das subunidades e a fixação de peptidoglicano recentemente sintetizado à parede celular. Nesta etapa intervêm os antibióticos β -lactâmicos, que, por serem análogos estruturais do substrato D-Alanina-D-Alanina, ao se ligarem covalentemente às PBP's vão inibir a última reacção de transpeptidação, impedindo a síntese de peptidoglicano.

Especificamente, estes antibióticos por conterem o anel β -lactâmico, provocam uma reacção de acilação com as transpeptidases, ou seja, inibem o estabelecimento

de pontes interpeptídicas. Este processo de interrupção baseia-se na união de β -lactâmicos a receptores específicos que se encontram localizados na superfície interior da membrana celular (Sousa 1998).

O anel β -lactâmico é constituído por três átomos de carbono e um átomo de azoto com radicais substituintes. De acordo com a figura 2, com os radicais, podem ser monobactâmicos, penicilinas, cefalosporinas, carbapenemos.

Os antibióticos monobactâmicos apresentam apenas o anel β -lactâmico, as penicilinas contêm o anel β -lactâmico ligado a um anel de tiazolidina. As cefalosporinas contêm como radical um anel de di-hidrotiazina e os carbapenemos têm carbono em vez de enxofre no anel tiazolidina (Sousa 1998).

Devido à sua toxicidade baixa para o hospedeiro, os β -lactâmicos são a primeira escolha no tratamento de infecções, sendo considerado o grupo de antibióticos mais usado na terapêutica, tanto em medicina humana como veterinária (Sousa 1998; Marín 2003).

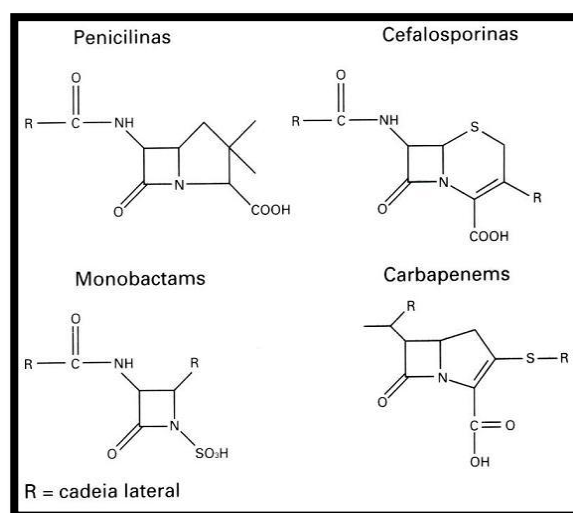


Figura 2. Estrutura química dos antibióticos β -lactâmicos (Williams 1999).

Devido ao seu modo de actuação, consideram-se os β -lactâmicos antibióticos bactericidas, podendo apenas actuar em bactérias em desenvolvimento e não em bactérias desprovidas de parede celular (Sousa 1998).

2.4. RESISTÊNCIAS AOS ANTIMICROBIANOS

A resistência a agentes antimicrobianos não é um fenómeno recente; as bactérias produtoras de substâncias antimicrobianas, necessitam de estar imunes e possuir mecanismos de protecção, como a presença de genes de resistência naturais (Ant^R), para as proteger da auto-destruição. Já os fungos apresentam uma estrutura eucariota, logo são naturalmente imunes aos antibióticos que produzem internamente (Cohen 1994; Sousa 2005).

A resistência a antibióticos pode assim, simplifadamente, ser definida como a capacidade que determinado microrganismo possui de se opor a uma substância que interfira com o seu desenvolvimento (Cohen 1997).

O uso de antibióticos revolucionou a abordagem nos casos de infecção e o seu sucesso gerou grande optimismo em relação à prevenção e ao tratamento dos processos infecciosos. Entretanto, a prescrição nem sempre criteriosa e racional desses antibacterianos, rapidamente gerou dificuldades pela progressiva resistência bacteriana a esses compostos, essencialmente depois dos anos 40. Esta situação verificou-se não só na clínica, como em práticas veterinárias e agrícolas (Goñi-Urriza 2000).

Assim, a frequência e o espectro de infecções por resistência a antibióticos tem significativamente aumentado a nível mundial durante as últimas décadas.

A disseminação de genes com resistências a antibióticos pode ser casualmente relacionada com o uso excessivo de antibióticos na saúde humana e na alimentação animal, o aumento da utilização de dispositivos e procedimentos invasivos, um maior número de hospedeiros susceptíveis, e lapsos nas práticas de controlo de infecção que levam ao aumento da transmissão de organismos resistentes (Dzidic 2003).

Este aumento tem sido atribuído a uma combinação de características microbiológicas, pressões selectivas, e mudanças sociais e técnicas que facilitam a transmissão de organismos resistentes (Dzidic 2003).

A manutenção no ambiente de uma pressão selectiva que permita o desenvolvimento das estirpes resistentes e que, por sua vez, elimine as estirpes sensíveis, vai auxiliar a proliferação das espécies resistentes. Assim, as estirpes com característica resistente passam a constituir o fenótipo dominante (Kapil 2005).

Sabe-se também que existem outros factores como as alterações demográficas e comportamentais, as viagens e o comércio de alimentos, a pobreza, as alterações tecnológicas e ainda factores de ordem económica que foram determinantes na emergência das resistências (Cohen, 1992; Cohen, 1997; Barbosa e

Levy, 2000; Levy 2002). Com todas estas razões contribuímos para as óptimas condições de crescimento e proliferação de bactérias resistentes aos antibióticos, capazes de disseminar-se por todo o mundo, representando um excelente exemplo da teoria evolutiva de Darwin (Barbosa 2000; Kapil 2005).

A resistência aos antimicrobianos tem como resultado o aumento da morbidade e mortalidade, bem como dos custos associados à saúde. A severidade das doenças, bem como o seu tempo de duração aumenta o que, associado à necessidade de se recorrer a antibióticos alternativos, frequentemente mais recentes e caros, aumenta substancialmente os custos dos cuidados médicos (Barbosa 2000).

A aplicação de antibióticos em produção animal, tem também, ao longo dos anos demonstrado a existência de uma relação casual entre a utilização de antibióticos nos animais de produção e o subsequente desenvolvimento de microrganismos resistentes e a sua disseminação para o Homem (Aarestrup 1999; Fàbrega 2008).

No caso da veterinária, os antibióticos podem ter vários fins, a terapêutica, profilaxia de doenças infecciosas e promoção do crescimento, sendo este último não permitido na União Europeia. Alguns promotores de crescimento pertencem a grupos de antibióticos essenciais em medicina humana para o tratamento de infecções graves.

A maioria dos antibióticos utilizados persistem no ambiente, por serem pouco absorvidos no intestino dos animais e, conseqüentemente serem excretados pelas fezes, contaminando e tornando as águas e o solo circundante importantes fontes de genes de resistência (Chee-Sanford 2001). Já em 1999, Teuber referiu que o problema da resistência aos antibióticos não se resolverá se houver um constante fluxo de genes de resistência na microbiota humana através da cadeia alimentar (Teuber 1999).

É da maior importância, principalmente por parte das autoridades de saúde pública, um maior empenho na prevenção das infecções e em programas de vigilância da resistência aos antibióticos, pois constitui um problema global e intergeracional, representando sérias implicações na saúde pública (Cohen 1994).

Assim sendo, a resistência aos antimicrobianos é a consequência natural da utilização dos antibióticos. Quanto mais utilizarmos estes compostos, maior será a velocidade de aparecimento e selecção de estirpes resistentes (Barbosa 2000; Barreto 2009).

2.5. PRINCIPAIS MECANISMOS DE RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS

Com a utilização dos antibióticos, a população bacteriana poderia ter sofrido drasticamente com os seus efeitos. No entanto, a flexibilidade genética das bactérias permitiu-lhes sobreviver e multiplicar-se sob a pressão selectiva dos antibióticos (Kapil 2005).

A resistência aos antibióticos pode ser adquirida ou intrínseca. A resistência adquirida pode ocorrer pela mudança mutacional ou pela aquisição de codificações de resistências do material genético que é transferido de outra bactéria por transformação, transdução e conjugação. A resistência intrínseca ou natural é característica da estirpe e é inerente à célula bacteriana que impede a acção de determinados antibióticos (Smith 1993; Cohen 1994).

Consideram-se quatro mecanismos bioquímicos de resistência aos antibióticos β -lactâmicos: a impermeabilização da parede celular, os sistemas de efluxo, a alteração da estrutura de PBP's e a inactivação do antibiótico por enzimas (Chroma 2010). Encontram-se descritos na figura 3, três desses mecanismos.

Também ocorrem situações em que existe a associação dos diversos mecanismos de resistência, tornando as bactérias multirresistentes, como no recente estudo de Lagacé-Wiens *et al* onde foi isolada, em Manitoba, Canadá, uma *Escherichia fergusonii* multirresistente, que expressava β -lactamases de espectro alargado. Esta multirresistência poderá estar associada à conjugação da produção das β -lactamases, aumento das bombas de efluxo e alterações na parede celular da bactéria (Sousa 2000; Lagacé-Wiens 2010).

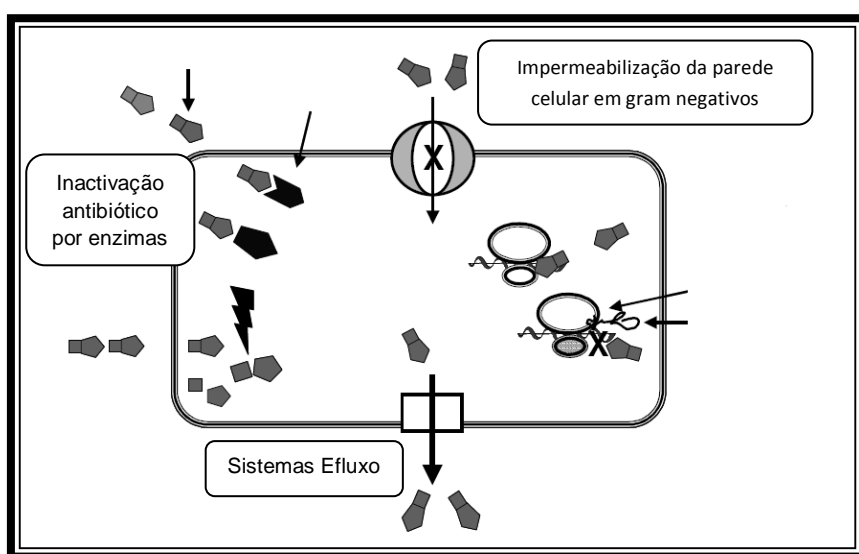


Figura 3: Mecanismos de resistência aos antibióticos. Fonte: Adaptado de (Yao 1995).

Estes processos podem ser genericamente definidos em duas situações. A diminuição da concentração intracelular do antibiótico, e uma modificação do alvo dos antibióticos.

Na primeira consideram-se as alterações da impermeabilização da parede celular, estrutura que por si só é uma barreira natural aos agentes antimicrobianos. Outro factor importante, são as porinas, estruturas presentes na membrana externa das bactérias gram negativas, que podem variar em número ou sofrer alterações estruturais, alterando a sua função de permeabilização da membrana celular, como canais hidrofílicos, aos compostos hidrofílicos, bem como impedem a entrada de antibióticos para o espaço intracelular.

Outro mecanismo são as bombas de efluxo, que bombeiam o antibiótico para o exterior da célula e este não atinge a nível intra-celular a concentração necessária para inibir o crescimento bacteriano.

Pode também ocorrer modificação do alvo inicial do antibiótico. A afinidade para este agente perde-se, por mutações nos genes plasmídicos ou cromossómicos, podendo surgir novos alvos de actuação (Chroma 2010).

Estas alterações podem também ocorrer nas PBP's, proteínas alvo dos β -lactâmicos, promovendo, em várias espécies, resistências a este grupo de agentes antimicrobianos.

Este processo surge também por inactivação ou apenas modificação dos antibióticos pela actuação de enzimas específicas, codificadas por genes presentes em elementos genéticos móveis como transposões, plasmídeos e integrões (Chroma 2010).

Este mecanismo de resistência de inactivação do agente por enzimas afecta principalmente, cloranfenicol (acetiltransferases) e aminoglicosídeos (acetiltransferases, fosfotransferases, adeniltransferases e nucleotidiltransferases) e os β -lactâmicos (β -lactamases).

As principais enzimas que podem hidrolizar os β -lactâmicos são as acilases, esterases e as β -lactamases.

2.6. BETA-LACTAMASES

As β -lactamases caracterizam-se por serem enzimas específicas, que vão hidrolizar o anel β -lactâmico pela quebra da ligação amida dos antibióticos β -lactâmicos, impedindo-o de formar qualquer um complexo com as PBP's. Por estabelecerem este complexo com os antibióticos β -lactâmicos, as PBP's perdem a sua actividade, não sendo sintetizada a parede celular, ocorrendo lise celular. As β -lactamases, ao tornarem os agentes antimicrobianos inactivos, são responsáveis por muitas lacunas em terapias antimicrobianas, sendo consideradas um importante mecanismo de resistência a estes antibióticos (Bush 1995; Bush 1997; Bush 2010).

A detecção das β -lactamases ocorre em bactérias gram positivo, como *Clostridium* spp e gram negativo, como *Enterobacteriaceae*, *Haemophilus influenza*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Pseudomonas aeruginosa* (Garau 2005).

As primeiras descrições do aparecimento destas enzimas ocorreram nos anos 40, inicialmente em *E.coli* por Abraham Chain e posteriormente em *S. aureus* (Bush 1995; Bradford 2001).

As β -lactamases podem apresentar no seu centro activo iões de zinco (Cricco 1999) ou, mais comumente, uma serina. As primeiras designam-se metalo- β -lactamases e as segundas serino- β -lactamases.

As semelhanças estruturais e a homologia de aminoácidos entre as serino- β -lactamases e as PBP's, suportam a hipótese de uma evolução com origem semelhante, podendo considerar-se estas lactamases como proteínas PBP's com grandes taxas de desacilação (Livermore 1995; Massova 1999; Livermore 2004).

Nos microrganismos gram positivo, as β -lactamases são excretadas para o ambiente e nas bactérias gram negativo ficam no periplasma (Bush 1995; Essack 2001).

Quanto à sua codificação genética, as β -lactamases podem ter origem constitutiva ou indutível, em genes cromossómicos ou plasmídicos. As β -lactamases de origem cromossómica, para determinadas espécies, são universais, já as que têm origem em plasmídeos são variáveis, podendo estes elementos ser transferidos entre estas. A sua mobilidade é conseguida por meio de transposões, que transportam a informação dos genes das β -lactamases dos plasmídeos aos cromossomas, permitindo deste modo a disseminação de genes resistentes entre a comunidade

bacteriana. Nas bactérias gram negativo, as β -lactamases cromossómicas podem ser constitutivas ou indutíveis. Já as β -lactamases plasmídicas têm origem constitutiva, exceptuando nos estafilococos que, normalmente são indutíveis (Marín 2003).

As β -lactamases são diferenciadas pelas suas estruturas primárias, agrupando-se por diferentes famílias, considerando-se as primeiras formas parentais as TEM-1 e SHV-1 (Jacoby 2006). A partir destas formas parentais, ocorreram mutações pontuais que levaram à alteração das suas estruturas primárias, surgindo assim as primeiras β -lactamases de espectro expandido (ESBL – *extended-spectrum β -lactamases*).

As ESBL actuam de forma semelhante às β -lactamases já existentes de espectro curto e largo, diferenciando-se por conseguirem hidrolisar mais antibióticos β -lactâmicos, como seriam os oximino- β -lactâmicos dos quais são exemplos as cefalosporinas de 3ª geração e o aztreonamo.

Knothe e colaboradores, em 1983, foram o primeiro grupo de trabalho a descrever a presença de ESBL's numa bactéria, sendo esta nova enzima uma mutação da SHV-1, com a substituição do aminoácido *Gly238* por uma *Ser*. Foi então denominada de SHV-2 (Knothe 1983).

Posteriormente, uma nova família de β -lactamases ESBL que ainda não havia sido descrita, é designada, a CTX-M, pela sua maior resistência à cefotaxima (do que à ceftazidima) (Cantón 2006).

As isoformas parentais SHV e TEM nunca se diferenciam entre si mais do que sete aminoácidos, ao contrário das CTX-M, que evoluíram para mais de 90 formas, entre elas as CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9, CTX-M-25. Estas estruturas podem diferir em cerca de 20 % na sua estrutura primária (Mendonça 2007), consideram-se que é a família de ESBL mais prevalente em Portugal e outros países no Mundo (Bonnet 2004; Pérez 2007).

Embora todas as β -lactamases catalisem a mesma reacção, houve necessidade de as classificar, devido à sua evolução. A primeira proposta de classificação foi em 1970, por Jacke Richmond, e mais tarde, por Richmond e Sykes. Esta organizava as β -lactamases não só pelo espectro hidrolítico destas, como também a localização cromossómica ou plasmídica dos genes que as codificam e a sua resposta aos inibidores das β -lactamases. Mais tarde, foi incluído na classificação o ponto isoeléctrico destas enzimas (Livermore 1995).

Existem duas classificações actuais, que são aceites e utilizadas pela comunidade científica. A classificação de Ambler e a classificação de Bush-Medeiros-Jacoby (Ambler 1980; Bush 1995; Bush 1997; Jacoby 2006; Bebrone 2007)

Na classificação inicialmente proposta por Ambler, em 1980, foram consideradas as sequências aminoacídicas das β -lactamases existentes, agrupando-as em quatro classes – A, B, C e D (Ambler 1980; Sousa 2005). As classes A, C e D correspondem a enzimas que hidrolisam os substratos formando uma enzima acil através do seu local activo de serina, incluem-se as serino- β -lactamases. Já a classe B compreende apenas metalo- β -lactamases (Garau 2005), que utilizam pelo menos um local activo do íon de zinco (ZnII) que vai facilitar a hidrólise do β -lactâmico (Bush 2010).

As classes C e D foram propostas posteriormente, sendo que a classe C é composta por β -lactamases com sequências proteicas semelhantes às da classe A, designadas por AmpC, já as β -lactamases da classe D têm semelhanças entre as classes A e C, denominando-se β -lactamases OXA. Esta abordagem estrutural é a mais consensualmente usada, não é afectada pela ocorrência de mutações, tornando-se assim a classificação mais acessível e menos polémica de agrupar um universo tão diverso de enzimas. Já a classificação funcional permite relacionar as várias enzimas com o seu papel a nível clínico, e a sua resistência selectiva a diferentes classes de β -lactâmicos (Bush 2010).

O sistema de classificação de Bush-Medeiros-Jacoby, actualizado em 1995, compreende as características funcionais e bioquímicas das enzimas β -lactamases, organizando-as pelos grupos do I ao IV, tabela 1. Pela primeira vez uma classificação relaciona o perfil dos substratos e dos inibidores, com a sua estrutura molecular (Bush 1995; Jacoby 2006).

As enzimas pertencentes ao grupo I são as cefalosporinasas, caracterizando por serem pouco inibidas pelo ácido clavulânico. No grupo II pertencem as β -lactamases, que na maioria das vezes são sensíveis a inibidores direccionados ao seu centro activo, correspondem às enzimas da classe A e D da classificação de Ambler, hidrolizando maioritariamente cefalosporinas e penicilinas.

Já as metalo- β -lactamases, pertencem ao grupo III, que são habitualmente resistentes à maioria dos inibidores clássicos, exceptuando o EDTA e o pCMB (*p*-cloromercuribenzoato). Estas enzimas hidrolizam os carbapenemos. Por fim, as enzimas do grupo IV compreendem as penicilinasas resistentes ao ácido clavulânico.

Nesta classificação, a atribuição de cada β -lactamases ao respectivo grupo é feita com base na atribuição do número do grupo a que pertence, seguido da letra do subgrupo onde se inserem. Como exemplo, as ESBL's pertencem ao grupo 2, subgrupo b, sendo então denominadas β -lactamases pertencentes ao grupo 2b (Bush 1995; Jacoby 2006):

Tabela 1. Sistema de classificação de β -lactamases por Bush-Medeiros-Jacoby, 1995 (Bush 1995).

Grupos	Exemplo	Principais características
I	AmpC	Cefalosporinas cromossômicas de bacilo gram negativo, não inibidas pelo ácido clavulânico. As enzimas deste grupo, caracterizadas a nível molecular, pertencem à classe C de Ambler;
II	β -lactamases inibidas pelo ácido clavulânico. Pertencem às classes moleculares A e D de Ambler. Compreende uma grande variedade de enzimas que se distribuem em vários subgrupos de acordo com o perfil de substratos:	
Subgrupo 2a	PC1 (<i>S. aureus</i>)	Penicilinas clássicas de bactérias gram positivo;
Subgrupo 2b	TEM-1, TEM-2, SHV-1	β -lactamases de largo espectro como as enzimas TEM-1, TEM-2, SHV-1 e as β -lactamases cromossômicas de <i>Klebsiella</i> ;
Subgrupo 2be	TEM-3 a 28, SHV-2 a 6	Incluem-se neste subgrupo: Enzimas que hidrolisam penicilinas e as cefalosporinas clássicas, e também actuam em cefotaxima, ceftazidima e aztreonam, sendo igualmente inibidas pelo ácido clavulânico. β -lactamases plasmídicas de espectro alargado (ESBLs-TEM, SHV e CTX-M), e algumas enzimas cromossômicas com características idênticas, como K1 de <i>Klebsiella oxytoca</i> e PER-1 de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ;
Subgrupo 2br	TEM-30 a 36; TRC-1	β -lactamases derivadas de TEM com resistência a inibidores;
Subgrupo 2c	PSE-1, CARB-3	Carbenicilinas (PSE-1, 3 e 4, CARB-3,4 e 5, BRO-1,2 e 3, AER-1 e SAR-1)
Subgrupo 2d	OXA-1, PSE-2	Oxacilinas (PSE-2, OXA-1, 2, 3-150, ARI-1) que inativam a cloxacilina e que são menos inibidas pelo ácido clavulânico do que as carbenicilinas;
Subgrupo 2e	<i>P. vulgaris</i>	Cefalosporinas codificadas pelo cromossoma e inibidas por baixas concentrações de ácido clavulânico. Inclui ainda as cefalosporinas plasmídicas que hidrolisam a cefotaxima mas que carecem de boa actividade hidrolítica face à penicilina e que são inibidas pelo ácido clavulânico;
Subgrupo 2f	IMI-1, NmcA	Carbapenemases que não são metaloenzimas;
III	IMP, VIM, L1	Metaloenzimas que são capazes de hidrolisar carbapenemos e não são inibidas pelo ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam. Pertencem à classe B de Ambler; (<i>S. maltophilia</i>)
Subgrupo 3a	IMP-1 a 24; VIM-1 a 23	β -lactamases que hidrolisam as penicilinas tão ou mais rapidamente do que o imipenem. As cefalosporinas são também rapidamente hidrolisadas por estas enzimas, mas mais lentamente do que o imipenem;
Subgrupo 3b	CphA, ImiS, Sfh-1	Enzimas da família Aeromonas, consideradas as verdadeiras carbapenemases. Têm uma elevada especificidade para hidrolisar os carbapenemos ;
Subgrupo 3c	FEZ-1	Apenas metalo- β -lactamases de <i>Legionella gormanii</i> . Esta enzima apresenta uma elevada actividade sobre as cefalosporinas e a ampicilina;
IV	<i>B. cepacia</i>	Pouco definido do ponto de vista molecular, compreende as penicilinas não inibidas pelo ácido clavulânico. Estas enzimas não são vulgarmente encontradas.

Os efeitos das β -lactamases nas diferentes espécies microbianas vão variar de acordo com a sua distribuição, prevalência da sua produção e da presença em espécies consideradas patogénicas. De acordo com isso, considera-se que as β -lactamases de classe A, que são mediadas por plasmídeos, são consideradas as mais relevantes, na prática clínica, pelos efeitos que produzem. Nesta classe incluem-se as β -lactamases de espectro expandido – *extended spectrum β -lactamase* (ESBL) (Nicolas-Chanoine 1996; Bradford 2001; Jacoby 2005)

As enzimas de espectro expandido hidrolizam antibacterianos monobactâmicos como o aztreonamo, e cefalosporinas de amplo espectro como a cefotaxima e ceftazidima (Jacoby 2005). Segundo Rasmussen e Bush, começa a ser cada vez mais comum encontrar microrganismos capazes de expressar novas enzimas que hidrolizam também antibióticos como carbapenemos, imipenemo e meropenemo (Rasmussen 1997).

Vários estudos sugerem que as mutações de genes de resistência aos antibióticos aumentam o espectro de actividade das ESBL (Philippon 2002). Também a pressão selectiva, provocada pelo uso constante e excessivo de cefalosporinas e outros β -lactâmicos, nos ambientes hospitalares, contribui para a disseminação de bactérias resistentes devido à presença de β -lactamases - ESBL's (Dzidic 2003).

Com a evolução de resistências microbianas cada vez mais “ multifacetadas”, a terapia antimicrobiana vai sendo dificultada, recorrendo-se cada vez mais a antibióticos de largo espectro como cefalosporinas de 4ª geração. Neste contexto, o aparecimento de espécies multirresistentes torna-se inevitável, bem como a sua disseminação a nível hospitalar, comunitário e ambiental.

Estas estirpes multirresistentes já foram isoladas no meio ambiente, em animais de produção, ambientes aquático e na comunidade, como elementos presentes na população microbiana autóctone do intestino no Homem (Barreto 2009), levando à contaminação de ecossistemas inteiros (Henriques 2006).

Efectivamente esta realidade pode ter origem não de uma situação pontual, mas da interacção de diversos factores, entre eles a pressão selectiva, como já foi referida, provocada pelo uso dos agentes antimicrobianos, dificultando a sobrevivência dos microrganismos na presença destes; a troca de informações genéticas entre bactérias e a sua transferência de genes de resistência, e possíveis mutações que podem ocorrer nesses mesmos genes de resistência, aumentando o espectro de resistência, como já foi referido (Barbosa 2000).

Com os avanços na biologia molecular, torna-se cada vez mais fácil obter as sequências aminoácidas dos genes que codificam a β -lactamases resistentes. Desde 2009 que está disponível o site <http://www.lahey.org/studies/> que refere toda a literatura associada às β -lactamases, e o código de referência no GenBank das sequências, tornando-se um instrumento importante para a classificação sistemática destas enzimas (Bush 2010).

Assim, as β -lactamases encontram-se entre uma das principais razões de infecções causadas por bactérias resistentes a antibacterianos em meio hospitalar, representando um dos maiores problemas de saúde pública do século XXI (WHOa. 2011).

A produção destas explica o porquê da sobrevivência de certos microrganismos em focos infecciosos, mesmo na presença de β -lactâmicos, bem como favorecem a sobrevivência de outros microrganismos sensíveis ao antibiótico (Bradford 2001).

2.6.1. INIBIDORES DAS BETA-LACTAMASES

Para contornar a crescente resistência aos β -lactâmicos promovida pelas β -lactamases, tem-se optado por duas estratégias. A alteração estrutural do antibiótico β -lactâmico e a inibição da β -lactamase propriamente dita, por ser inibida por um composto estruturalmente relacionado ao substrato β -lactâmico (Gniadowski 2008).

A modificação estrutural do β -lactâmico vai permitir que a enzima não tenha mais substrato para hidrolisar, deixando assim de estar activa.

Os compostos inibidores que inibem a acção das β -lactamases possuem uma ligação amida do grupo β -lactâmico, similares às penicilinas, tendo também uma cadeia lateral modificada. São compostos que têm características semelhantes aos antibióticos, suficientes para que as β -lactamases se identifiquem como o substrato. Estas características vão permitir aos inibidores ligarem-se reversivelmente ou irreversivelmente às β -lactamases, mantendo-as inactivas, ligando-se como substratos prejudiciais. Actualmente (Figura 4) são frequentemente utilizados em terapias clínicas três importantes inibidores: o ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam (Williams 1999).

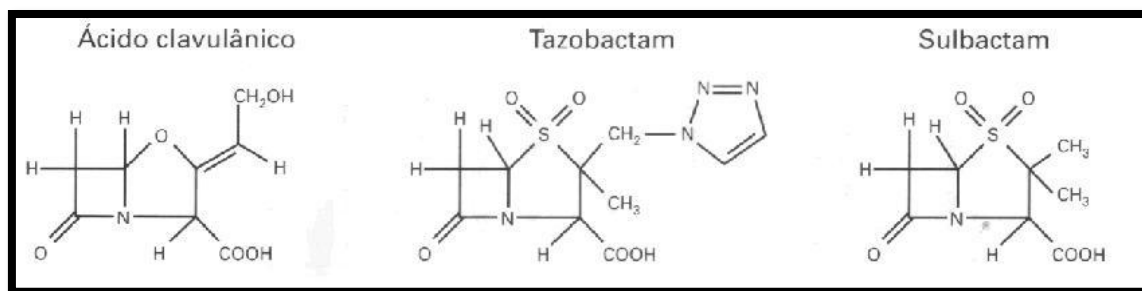


Figura 4. Estrutura química dos inibidores de β -lactamases (Williams 1999).

A conjugação terapêutica entre um antibiótico β -lactâmico e um inibidor de β -lactamases tem demonstrado bons resultados no tratamento clínico de bactérias resistentes a este grupo de antibióticos.

O inibidor ácido clavulânico foi isolado em 1976, em *Streptomyces clavuligerus*. Este possui uma estrutura bicíclica, com um anel β -lactâmico e um anel oxazolidínico, onde houve substituição do átomo S por um O, diferindo por esta razão das penicilinas.

O sulbactam e o tazobactam pertencem à família das sulfonas do ácido penicilânico e são igualmente e estruturalmente formadas por uma estrutura bicíclica. O sulbactam apresenta um mecanismo de inibição semelhante ao do ácido clavulânico, actuando como inibidor irreversível das β -lactamases da classe A de Ambler. O inibidor tazobactam actua também nas β -lactamases da classe A e algumas da classe D (Essack 2001).

As associações entre antibióticos e inibidores de β -lactamases são particularmente úteis no tratamento das infecções polimicrobianas (Kanj 2011). As uniões mais comuns são o ácido clavulânico com a amoxicilina e ticarcilina, sulbactam associado à ampicilina e à cefalosporina de 3ª geração (cefoperazona) enquanto, que, o tazobactam tem sido associado à piperacilina (Sousa 2005).

2.6.2. DETECÇÃO DAS BETA-LACTAMASES

Pela sua acção, é necessária uma detecção eficaz das β -lactamases, de forma a tornar a sua identificação mais rápida.

Estas podem ser detectadas fenotipicamente ou genotipicamente.

Pelo seu fenótipo, o laboratório de referência CLSI (Clinical Laboratory Standards Institute), que estabelece procedimentos padronizados, refere o perfil de susceptibilidade dos isolados produtores das β -lactamases aos β -lactâmicos. Descreve dois métodos para a confirmação de ESBL's para *E.coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Klebsiella oxytoca*, a metodologia E-test e a Difusão por disco.

Métodos como o E-test, utilizam uma tira impregnada com antibiótico a diferentes concentrações ao longo desta, onde é colocada em meio de Mueller Hinton Agar, um meio nutritivo, inoculado com suspensão do microrganismo, sendo verificado, após as 24h, a evolução dos halos de inibição. Permite assim, a leitura da CMI – concentração mínima inibitória, a partir da escala que a tira descreve. Nas extremidades a tira contém a cefalosporina a estudar e na outra a mesma cefalosporina combinada com um inibidor de β -lactamases, o ácido clavulânico. Segundo Ercis e colaboradores, 2007, quando a bactéria tem uma CMI ao antibiótico em estudo, três vezes superior ao do mesmo antibiótico com a adição do ácido clavulânico, pode-se concluir que a bactéria apresenta um fenótipo positivo para a produção de ESBL's (Ercis 2007).

Outra metodologia, muito utilizada é o uso da difusão dos discos impregnados com antibiótico. A estirpe bacteriana em estudo é inoculada em meio Mueller Hinton Agar, onde se colocam depois os discos impregnados com os antibióticos. A placa é inoculada durante 24 horas onde depois se poderá visualizar o crescimento da bactéria em todo o meio, exceptuando nos locais onde houve inibição de crescimento por acção do antibiótico, circundando os discos – halo de inibição. Os halos são avaliados, onde a presença de uma cefalosporina e de outra cefalosporina associada a ácido clavulânico, em que um aumento igual ou maior a 5 milímetros no halo de inibição da cefalosporina com o inibidor, comparativamente com a outra situação, confirma a presença de ESBL.

Existem também metodologias automatizadas como o Sistema Vitek (bioMérieux), Phoenix (BD, EUA) ou WalkAway (MicroScan, EUA) (Snyder 2008).

A detecção genotípica baseia-se na caracterização molecular do DNA genómico ou do DNA plasmídico da bactéria em estudo, identificando o gene codificador da β -lactamase presente. O DNA plasmídico tornou-se uma importante ferramenta pois, maioritariamente em isolados hospitalares, os fenómenos de

transmissão horizontal dos genes que levam à presença de ESBL's, ocorre neste DNA.

No entanto, torna-se uma metodologia complexa pois existem diversos genes codificadores de ESBL's, bem como a ocorrência frequente de mutações que leva ao aparecimento de novas isoformas desses mesmo genes. Os vários métodos utilizados são o PCR, PCR Multiplex, PCR Real Time, a sequenciação e a pirosequenciação, conforme descrito na tabela 2 (Chroma 2010).

Tabela 2. Métodos de detecção genotípica das β -lactamases (Chroma 2010).

Método	Descrição
PCR	Utilização de primers específicos para o gene a pesquisar, como <i>bla</i> _{SHV} , <i>bla</i> _{TEM} ou <i>bla</i> _{CTX-M} . Depois da reacção efectua-se uma electroforese para conferir a presença ou ausência do gene.
PCR Multiplex	Utilização de primers específicos para os vários genes a pesquisar, podendo-se identificar vários genes ao mesmo tempo, na mesma reacção; podendo o isolado a analisar conter vários genes como <i>bla</i> _{SHV} , <i>bla</i> _{TEM} e <i>bla</i> _{CTX-M} . Torna o procedimento menos moroso e menos dispendioso.
PCR Real Time	Utilização de primers específicos para o gene em estudo, com a diferença de que os genes pretendidos são detectados a partir da emissão de fluorescência pela utilização de um marcador. Vai permitir não só a sua detecção, como quantificação pelo estudo da fluorescência emitida. Quanto maior a fluorescência emitida, maior quantidade de gene. Não é necessário proceder a uma electroforese no final pois os dados são transmitidos directamente para o software, em tempo real.
Sequenciação	Procedimento após a realização de PCR, que permite, a partir da reacção de sequenciação, a sequência nucleotídica exacta do gene em estudo. Permite assim a identificação do gene codificador da família (ex. SHV) e determinar o subtipo (ex. SHV-2). Método muito dispendioso, não sendo possível a sua utilização em larga escala.
Pirosequenciação	Processo com as mesmas definições que a sequenciação, com a vantagem de se poder obter os resultados em directo e sob a forma de picos (pirograma), devido à emissão de luz que tem intensidade directamente proporcional à quantidade de pirofosfato que vai ser libertado durante a síntese de DNA. Nos dados, quanto maiores forem os picos dos resultados, maior a quantidade de pirofosfato libertada.

É comum a ocorrência de erros laboratoriais na avaliação da susceptibilidade aos antibióticos na presença de bactérias produtoras de ESBL's, pelo que se torna importante a detecção da presença destas, para que se possa resolver possíveis lapsos.

3. QUALIDADE DAS ÁGUAS BALNEARES

3.1. ÁGUAS BALNEARES COSTEIRAS E INTERIORES

A água é um recurso natural escasso, cuja qualidade tem que ser protegida, defendida, gerida e tratada de acordo com o seu uso.

São águas balneares as águas superficiais, quer sejam interiores, costeiras ou de transição, tal como definidas na Lei da Água (Lei n.º 58/2005, de 29 de Dezembro), em que se preveja um grande número de banhistas e onde a prática banhear não tenha sido interdita ou desaconselhada de modo permanente. A Gestão das águas balneares torna-se assim essencial na protecção da saúde humana e na preservação e melhoria da qualidade do meio ambiente (DL135/2009 ; Lei 58/2005 2005).

As descargas de águas residuais domésticas e de indústrias animais em águas balneares tanto costeiras como interiores determinou a necessidade de uma monitorização de indicadores microbiológicos de contaminação fecal de forma a controlar a qualidade dessas mesmas águas de uso recreativo. Actualmente é pesquisada e quantificada a presença de enterococos intestinais e *E.coli*, segundo o Decreto-Lei 135/2009 de 3 de Junho. A avaliação da qualidade das águas balneares é feita com base nos programas de monitorização, que são realizados anualmente. Os valores padrão estão descritos na tabela 3 para as águas balneares costeiras e de transição e na tabela 4 para as águas interiores (DL135/2009).

Tabela 3. Valores padrão e classificação para as águas balneares costeiras e de transição.

Águas balneares costeiras e de transição				
Parâmetro	Qualidade EXCELENTE	Qualidade BOA	Qualidade ACEITÁVEL	Métodos de análise de referência
<i>E. coli</i> (UFC/100 mL)	250 (*)	500 (*)	500 (**)	ISO 9308-3 ou ISO 9308-1
Enterococos (UFC/100 mL)	100 (*)	200 (*)	185 (**)	ISO 7899-1 ou ISO 7899-2

Legenda: (*) com base numa avaliação do percentil 95 da função densidade de probabilidade da distribuição log-normal de base 10. (**) com base numa avaliação do percentil 95 da função

densidade de probabilidade da distribuição log-normal de base 10. UFC: unidades formadoras de colónias. (DL135/2009).

Tabela 4. Valores padrão e classificação para as águas balneares interiores.

Águas balneares interiores				
Parâmetro	Qualidade EXCELENTE	Qualidade BOA	Qualidade ACEITÁVEL	Métodos de análise de referência
<i>E. coli</i> (UFC/100 mL)	500 (*)	1000 (*)	900 (**)	ISO 9308-3 ou ISO 9308-1
Enterococos (UFC/100 mL)	200 (*)	400 (*)	330 (**)	ISO 7899-1 ou ISO 7899-2

Legenda: (*) com base numa avaliação do percentil 95 da função densidade de probabilidade da distribuição log-normal de base 10. (**) com base numa avaliação do percentil 95 da função densidade de probabilidade da distribuição log-normal de base 10. UFC: unidades formadoras de colónias. (DL135/2009)

No final de cada época balnear a avaliação das águas é efectuada, sendo depois classificadas como “Excelente”, “Boa” e “Aceitável” tendo em conta os valores obtidos.

Para a classificação das águas balneares costeiras e de transição consideram-se os dados da época balneares do próprio ano e das três épocas balneares anteriores. Já nas águas balneares interiores consideram-se os valores da época balnear do ano transacto e das duas épocas anteriores.

As entidades portuguesas envolvidas na monitorização das águas balneares são o Instituto da Água, a Administração de Região Hidrográfica, a Agência Portuguesa do Ambiente e a Delegação de Saúde Regional. Na avaliação destas intervêm o Instituto da Água, a Administração de Região Hidrográfica, a Delegação Geral da Saúde, bem como a Comissão Técnica de Acompanhamento da aplicação do DL 135/2009 (DL135/2009).

A facilidade com que as bactérias se tornaram resistentes aos antibióticos geralmente usados bem como o aumento do nível de contaminação fecal detectado em muitas águas naturais superficiais constitui um problema sério de saúde pública.

Assim, este decreto-lei prevê a monitorização, avaliação e classificação das águas balneares, bem como a restrição da prática balnear em determinadas águas.

Vários estudos têm demonstrado a presença de bactérias resistentes a antimicrobianos em águas balneares por todo o mundo (Mudryk 2005; Fernandes

2010), tornando-se assim indispensável a prevenção e tratamento das águas recreativas, pela forte possibilidade de ocorrência de ingestão dessas mesmas águas, promovendo a aquisição de genes de resistência por bactérias comensais do hospedeiro humano (Biyela 2004).

Os microrganismos nativos do ambiente aquático também se tornaram relevantes para sua capacidade de adquirir genes de resistência de organismos comensais ou patogénicos introduzidos no ambiente. Estes poderão ser considerados como um reservatório natural de genes, não caracterizados, de resistência a antibióticos em ambiente marinho, que, por sua vez, podem introduzir as informações genéticas de resistências em bactérias humanas (Jones 1986; Young 1993; Ding 2010).

A implementação de planos de controlo das fontes de contaminação fecal de várias origens no território português resultou numa melhoria crescente e significativa da qualidade das águas balneares (SNIRH 2011).

A presença de indicadores de contaminação fecal, como *E.coli* e Enterococos, em águas costeiras, deve-se essencialmente a descargas de águas residuais urbanas não tratadas e descargas de resíduos de produções animais e/ou industriais.

No entanto, para a sobrevivência destes microrganismos, é necessário que as águas reúnam um conjunto de características adequadas ao seu crescimento e desenvolvimento, como a sua composição química (pH, salinidade, presença de poluentes e sedimentos), condições ambientais (temperatura das águas, pluviosidade, marés e radiação solar e presença de nutrientes), ou até mesmo a microfauna (fenómenos de parasitismo e presença de predadores) (Bonilla 2007; Zhu 2011).

O impacto dos raios solares aparenta ser, segundo Lester Sinton, um dos factores com maior importância, pois condicionam a sobrevivência das bactérias. O nível de susceptibilidade destas, vai depender das características intrínsecas de cada indicador, dos comprimentos de onda dos raios solares, bem como da penetração destes na água do mar. Os coliformes apresentam maior sensibilidade aos raios solares que os enterococos, causando danos directos no DNA destes microrganismos, produzindo um efeito bactericida. Este efeito é diminuído com o aumento da profundidade, bem como nos períodos de contaminação nocturnos. Para os parâmetros pH e oxigénio dissolvido, embora não tenham efeito na ausência de radiação solar, quando estão na presença destes há um aumento do efeito de inactivação no crescimento de *E.coli* e Enterococos (Sinton 2002; Bolton 2010).

A presença de indicadores fecais, *E.coli* e *Enterococos* é detectada não só nas águas marinhas, como também nas areias e areais, quer em praias costeiras, como praias fluviais (Bonilla 2007).

4. UTILIZAÇÃO DE ANTIBIÓTICOS EM PRODUÇÃO ANIMAL

Pela pressão dos mercados, surgiram sistemas intensivos de produção animal, que vão de encontro às novas necessidades da sociedade actual. O aumento das populações e da urbanização provocou drásticas variações tanto na localização, como organização das produções animais a nível mundial (Steinfeld 2004). Estas alterações diferem da produção normal e natural por uma maior manipulação dos processos pelo Homem (mais interferência não naturais), bem como modificações das actividades morfológicas normais do animal através do controlo do metabolismo por agentes externos.

Na totalidade da produção agrícola, 40% desta corresponde a produções animais, pelas alterações nos estilos de vida e hábitos alimentares nos países desenvolvidos, que gradualmente vão substituindo produtos hortícolas e cereais por produtos de produção intensiva animal como leite, ovos e carnes (Heiling 2002; Steinfeld 2004).

Tabela 5-A. Estimativa do consumo de agentes antimicrobianos, em Kg, pela prescrição destes em produção animal, no período de 1990 a 2000, Dinamarca.

Tetracyclines	9300	22000	36500	9000	12900	13700	12100	16200	24000
Penicillins, b-lactamase sensitive	5000	6700	9400	8800	7200	11200	14300	14700	15100
Other penicillins, cephalosporins	1200	2500	4400	4500	5800	6100	6700	6600	7300
Sulfonamides + trimethoprim	3800	7900	9500	6300	4800	6900	7700	6800	7000
Sulfonamides	8700	5900	5600	1800	2100	1400	1000	1000	1000
Macrolides, lincosamides, pleuromutilins	10900	12900	11400	9500	7600	6600	7100	8700	15600
Aminoglycosides, colistin	7700	8500	8600	7600	7100	6100	7800	7500	10400
Others ^(b)	6700	6800	4400	2100	600	650	650	350	300
TOTAL	53300	73200	89800	49600	48100	52800	57350	61900	80700

Fonte: Adaptado de (DANMAP 2010).

Pelas constantes mudanças nas últimas décadas, foi imprescindível o aumento das regras de segurança alimentar e sanitárias facilitando assim o comércio internacional. Existe também uma busca cada vez maior, por parte dos produtores agrícolas, de fornecer para uso doméstico produtos cada vez mais seguros e

saudáveis, tornando-se um desafio por todas as vertentes, principalmente nos países desenvolvidos onde as exigências são cada vez maiores (Wegener 2010).

Com o aumento de produtos de origem de produção animal e dos próprios animais, está associado um aumento do risco de propagação a nível mundial de doenças de origem animal, como brucelose e trichineloses, e infecções alimentares com contaminações de alimentos por, como exemplo, *Salmonella* ou *Escherichia coli*. Também pode ocorrer um aumento do aparecimento de zoonoses, doenças emergentes que podem afectar tantos os animais de produção como o humano, como a recente gripe das aves (Steinfeld 2004).

Assim, a utilização de antibióticos na veterinária, principalmente nas produções animais, aumentou drasticamente. A nível mundial, 70% dos antibióticos anualmente produzidos são utilizados na prática agrícola e animal (Schwarz 2001; Aarestrup 2008).

Nas produções animais, os antibióticos são utilizados com três finalidades: como profilaxia e terapia de infecções, e, nalguns países em que ainda são permitidos, como promotores de crescimento.

Os antibióticos utilizados como profilaxia e terapia de infecções podem ser utilizados também na medicina humana, como os β -lactâmicos, tetraciclina, aminoglicosídeos, macrólidos e sulfonamidas (Schwarz 2001).

No caso da profilaxia de infecções, este método é utilizado como tratamento de prevenção de infecções, em produções onde a densidade animal é muito elevada. O tratamento pode ser administrado a um só animal, no caso de existir uma grande probabilidade de ocorrência de infecção, ou em série, tratamento metafiláctico. Esta metodologia permite assim prevenir o aparecimento de infecções ou mesmo controlar a disseminação da doença no caso de diagnóstico nalgum animal da produção (Schwarz 2001; Dibner 2005).

Os antibióticos com fins profiláticos, também são administrados no transporte de animais, vacinação ou mesmo cirurgias, por serem animais em que estes estão mais debilitados e, por sua vez, mais susceptíveis à contracção da infecção.

Apesar de todos os benefícios, a profilaxia animal é considerada uma das práticas na indústria animal responsável pela ocorrência e disseminação de genes de resistência e selecção de bactérias resistentes.

Outra actual aplicação de antibacterianos em animais de produção é a terapia de infecções. Esta metodologia baseia-se no tratamento de um animal ou vários animais que tenham contraído doença, pelo que lhes são administrados os antibacterianos adequados ao tratamento, durante um certo tempo, fazendo com que exista sempre uma concentração mínima de antibiótico no corpo do animal até que a infecção seja eliminada (Mathew 2007). Nestas situações todos os antibióticos utilizados têm que ser sempre supervisionados pelo médico veterinário, que prescreve os medicamentos adequados. No estudo para o tratamento da infecção, têm-se em conta as características do animal, peso, alimentação (quantidade de alimento e água ingeridos), as características dos próprios antibióticos, como a sua farmacodinâmica e farmacocinética, para assim se calcular a taxa de inclusão do antibiótico (Steinfeld 2004).

Os antibióticos podem ser administrados aos animais por via parentérica, pela água ou alimentos, sempre de acordo com o tipo de infecção e a duração do tratamento (90/167/CEE 26 de Março de 1990; Steinfeld 2004).

Por fim, o uso da maioria dos antibióticos como promotores de crescimento, utilizados desde finais dos anos 40, foi banido da União Europeia na última década, sendo, no entanto ainda usados em alguns países, como os Estados Unidos.

A sua utilização é feita pela adição de antibióticos, em doses subterapêuticas, às rações de animais ainda em fase de crescimento, afectando a flora intestinal do animal, que diminui a sua acção na presença do antibiótico. Os animais crescem mais rapidamente e necessitam de menor quantidade de alimento para produzir maior quantidade de carne, pelo que, em termos económicos se torna vantajoso, pois aumenta 3 a 12% o índice de consumo (relação entre o peso do alimento consumido pelo animal e o ganho de peso desse mesmo animal) (Aarestrup 2000).

Todos os promotores de crescimento estão devidamente legislados, bem como quais as condições da sua administração nas produções animais, qual o tipo de animal, a dosagem e a duração do tratamento. No caso da União Europeia, a utilização destes antibacterianos está então sujeita a legislação europeia e portuguesa, que especifica as substâncias farmacológicas activas para as quais foram fixados limites máximos de resíduos (2005/187/CE 2 de Março de 2005).

A eliminação e substituição de antibióticos como promotores de crescimento, apesar de alguns terem sido definitivamente banidos, é feita progressivamente, à medida que novos estudos vão surgindo, a comprovar o seu prejuízo na saúde

humana e animal. As proibições têm vindo a aumentar, desde a avoparcina em 1997, a ardacina no início de 1998 e bacitracina-zinco, virginiamicina, fosfato de tilosina e espiramicina no final desse mesmo ano. Mais tarde, em 2006, foram retirados mais quatro antibióticos, a avilamicina, a monensina de sódio e a salinomicina de sódio e o flavofosfolipol (52001DC0333 20 de Junho de 2001).

Relativamente à utilização de aditivos alimentares nas rações animais, esta também está contemplada pela legislação comunitária relativa aos aditivos alimentares (Directiva 89/107/CEE do Conselho - JO L 40 de 11 de Fevereiro de 1989) onde são estabelecidos os princípios subjacentes à aprovação destes aditivos e às suas utilizações nos géneros alimentícios. São autorizadas para a preservação de determinados géneros alimentícios dois agentes antimicrobianos, a Nisina (E 234) e a Natamicina (E 235) (89/107/CEE 21 de Dezembro de 1988).

A monitorização do aparecimento de resíduos (substâncias químicas incluindo agentes antimicrobianos) em alimentos, animais vivos e em produtos de origem animal, é exigida pela legislação comunitária (Directiva 96/23/CE do Conselho, bem como os limites máximos de resíduos ao abrigo do Regulamento (CEE) nº 2377/90) que garante uma prudente utilização dos agentes antimicrobianos na medicina veterinária (96/23/CE 29 de Abril de 1996).

A presença de resíduos de antibióticos em carnes, devido ao uso destes em produções animais, pode influenciar e afectar a ecologia da microflora do intestino do consumidor. A organização americana Food and Drugs Administration (FDA), defende que a exposição humana a bactérias com resistências a antimicrobianos, se deve essencialmente à ingestão destas pelos alimentos de origem animal, tendo sido bactérias que já foram previamente seleccionadas, devido ao uso de antimicrobianos em animais de produção (FDA 2003).

Os agentes antibacterianos usados na produção animal, também podem disseminar-se no meio ambiente quando o estrume é aplicado nos campos, em práticas agrícolas. Estes antibióticos podem ser depositados à superfície do solo e atingir inclusivamente as águas subterrâneas (Kümmerer 2004).

Uma das principais acções no sentido de minimizar a causa central e as formas de reservatórios de resistências antibacterianas passou pela restrição do uso de antibióticos como promotores de crescimento. A administração destes agentes nos

animais de produção, por serem em doses subterapêuticas, favoreceu a criação de ambientes adequados à selecção de patogénicos com genes de resistência.

Esta situação tornou-se num grave problema de saúde pública devido ao aparecimento destas bactérias resistentes dos animais, em humanos pela transferência de material genético.

Para além dos problemas de saúde pública, esta situação é importante em termos económicos pois as infecções por bactérias resistentes vão aumentar o custo das terapias pela necessidade de utilização de medicamentos mais dispendiosos e mais tempo de internamento nos hospitais.

A WHO, World Health Organization, entre outras instituições como a FDA, recomendou a restrição dos antibióticos utilizados em humanos, para serem exclusivos, e não serem utilizados em animais para outros tratamentos (FDA 2003; WHOa. 2011).

O uso de antibióticos em produções animais é necessário, mas há que tomar medidas preventivas, de forma a se poder minimizar os danos. Para isso é necessário compreender melhor os riscos envolvidos da sua utilização excessiva. A acção da EU, de ter banido o uso de antibióticos como rotina na agricultura já demonstrou uma redução do aparecimento de bactérias resistentes, como demonstram os resultados do estudo realizado na Dinamarca, na figura 5. Os Estados Unidos ainda continuam a usar os antibióticos com fins não terapêuticos nestas produções (FDA 2003).

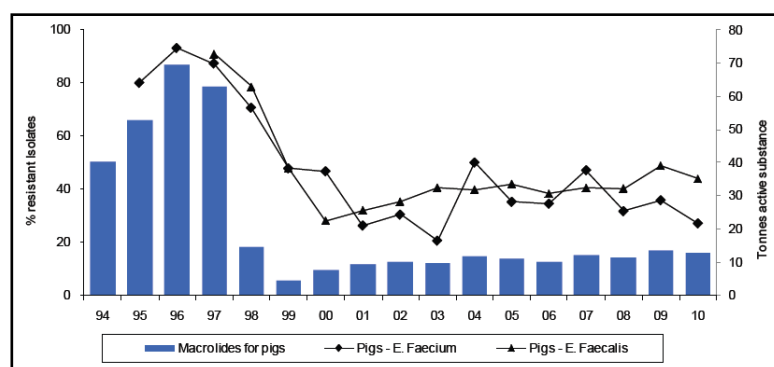


Figura 5. Resistências (%) à eritromicina em *Enterococcus faecium* e *Enterococcus faecalis* isolados de porcos relacionados com o consumo de macrólidos, em toneladas, na Dinamarca. Fonte: Adaptado de (DANMAP 2010).

São necessários mais estudos epidemiológicos a nível mundial, a fim de se averiguar a extensão do problema e se poder combater e delinear estratégias para minimizar o problema das resistências e manter a acção eficaz dos antibióticos existentes. Com dados específicos como que classes de antibióticos são utilizadas nos diversos processos agrícolas, quais as quantidades e aplicações, é possível relacionar o uso de antibióticos com a presença de resistências em animais, no ambiente ou humanos, e tomar decisões mais concretas pois é possível saber o impacto que estas vão ter. No entanto, a obtenção destes dados tem sido difícil na maioria dos países (Martínez 2008).

Existem excepções, como a Dinamarca, que desde 1996, regista bases de dados, como a VETSTAT ou DANMAP, todos os antibióticos prescritos para terapias humanas e utilizados em medicina veterinária. Nesta base é identificado o antibiótico, qual a quantidade adquirida, qual a indústria, tipo de animal e idade. Também são descritas as infecções que ocorrem na base de dados do Centro Dinamarquês de Zoonoses, bem como anualmente os fabricantes têm que apresentar um relatório das quantidades de antibacterianos vendidos, à Agência Médica Dinamarquesa, sendo possível inferir sobre o consumo de antimicrobianos em produções animais, como demonstra a figura 6 e a tabela 5. Entre 1990- 2006 a produção animal dinamarquesa aumentou 8%, embora se verifique um decréscimo da utilização de antibióticos de 14%. Nos Estados Unidos, não existem informações públicas sobre a quantidade de antibióticos prescritos, nem iniciativa dos fabricantes e produtoras animais de revelar dados sobre a venda e uso destes (FDA 2003).

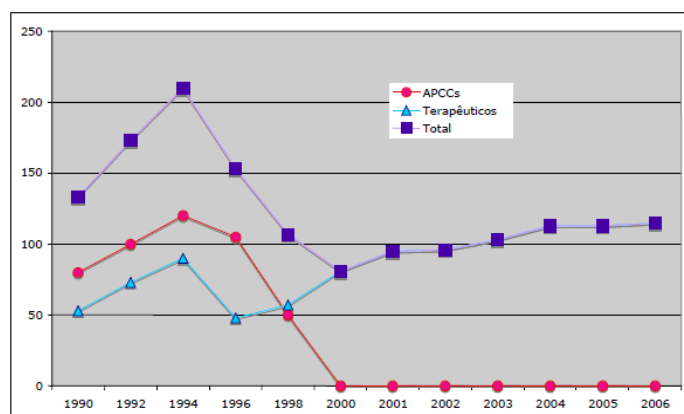


Figura 6. Consumo de antimicrobianos, em toneladas, em animais de produção na Dinamarca entre 1990-2006. Fonte: Adaptado de (DANMAP 2006).

A proibição do uso de antibióticos como promotores de crescimento em animais e a utilização de antibióticos usados em medicina humana, reduz de forma eficaz a exposição humana de bactérias resistentes nos alimentos consumidos. A produção animal em sistemas intensivos é possível, sem o uso sistemático de antibióticos para prevenção de doenças, com custos reduzidos (Aarestrup 2008; Wegener 2010). Têm surgido cada vez mais estudos sobre alternativas ao uso de antibióticos como promotores de crescimento, como a utilização de enzimas, substâncias pré e pró-bióticas ou plantas com componentes bioativos. Apesar da eficácia do crescimento animal não ser a mesma, estas alternativas podem começar a ser utilizadas como substitutos dos antibióticos (Huyghebaert 2011).

Assim, devido à necessidade de aumentar as produções de alimentos de origem animal, pela evolução prevista das populações (duplicação da populações nos próximos 50 anos) torna ainda mais relevante o estudo das implicações destas produções no meio ambiente.

Tabela 5-B. Consumo de agentes antimicrobianos em bovinos em Doses Diárias (ADDs – massa em kg de animais tratados, medida pelo peso corporal dos animais).

Therapeutic group	Tetra cyclines	Amphenicols	Amino-penicillins ^(c)	Penicillin's, b-lactamase sensitive	Cephalosporin ^(a)	Sulfonamides and trimethoprim	Macrolides	Lincosamides / spectinomycin ^(c)	Aminoglycosides (local GI)	Colistin (local GI)	Fluor oquinolones	Penicillin streptomycin combinations	Total
Year	Cows and bulls (1000's ADD₆₀₀)												
2005	186	1	58	490	71	65	112	2	19	0	0	22	1027
2006	193	1	57	498	64	61	116	2	9	0	0	22	1021
2007	235	1	68	610	79	73	91	2	2	0	0	28	1189
2008	257	1	80	702	85	75	65	1	1	0	0	34	1302
2009	279	2	84	804	73	73	53	1	2	0	0	36	1407
2010	269	1	79	835	70	73	38	0	2	0	0	42	1410
	Calves (1000's ADD₁₀₀)												
2005	574	61	193	170	33	162	562	19	127	39	2	142	2083
2006	534	67	145	180	30	141	879	13	108	7	1	136	2242
2007	561	96	131	183	37	154	881	16	92	8	1	131	2290
2008	528	129	105	168	30	133	804	13	77	11	0	113	2111
2009	556	150	102	173	22	166	768	9	95	10	0	117	2167
2010	615	180	123	166	20	193	475	12	100	15	0	120	2018

Fonte: Adaptado de (DANMAP 2010).

5. PERSPECTIVA GLOBAL DAS RESISTÊNCIAS

A emergência de infecções causadas por bactérias resistentes e multirresistentes, produtoras de ESBL's, tem vindo a aumentar exponencialmente, tanto a nível hospitalar como comunitário.

Inicialmente a maioria das infecções ocorreram por *Klebsiella pneumoniae*, produtora de β -lactamases TEM e SHV. Só depois ocorreu um aumento de infecções, por *E.coli* produtoras de ESBL's da família CTX-M, que começou a ter impacto significativo, em diversos países do mundo.

Segundo estudos elaborados por grupos portugueses, Mendonça *et al* 2007 e Fernandes *et al* 2009, em Portugal, a tendência desta emergência é semelhante aos outros países do mundo, principalmente com grande disseminação para as *E.coli* produtoras de CTX-M-1 e CTX-M-15. Existe no entanto carência de dados para estudos mais aprofundados (Mendonça 2007; Fernandes 2009).

O uso de antibióticos selecciona as resistências, independentemente da razão da sua utilização, em que podem ocorrer evoluções, primeiro nas populações bacterianas em meio ambiente, afectando depois as populações bacterianas associadas ao ser humano, tornando-se assim um problema de saúde pública (Ibekwe 2011).

Assim, em 1999 iniciaram-se pela União Europeia (UE), projectos de prevenção e luta contra as resistências aos antimicrobianos, que actuaram em várias áreas estratégicas, com diferentes aproximações a este problema de Saúde Pública.

A base deste projecto é a recomendação específica do uso prudente dos agentes antimicrobianos. As diferentes componentes da questão foram então divididas em quatro áreas base: prevenção, a vigilância e cooperação internacional, a investigação e o desenvolvimento de novos produtos.

A Comissão da UE encoraja os vários países membros e não membros, a promover uma cooperação internacional, ou seja, a desenvolver redes coordenadas de vigilância, de forma a melhorar a obtenção de dados acerca do consumo comunitário de antibióticos, pelo que, em Janeiro de 1999, foi criada uma Rede Comunitária de Vigilância Epidemiológica e de Controlo das Doenças Transmissíveis (2003/534/CE 17 de Julho de 2003). Esta rede é um sistema de alerta e resposta rápida de ameaças para a saúde pública e vigilância epidemiológica das doenças

transmissíveis. Também em 1998, no sentido de se obterem mais dados fiáveis e se poder ter termo de comparação entre as informações obtidas, relativas à resistência a antimicrobianos para fins de saúde pública na Europa, foi fundado o Sistema Europeu de Vigilância da Resistência a Antimicrobianos (EARSS). A maioria dos países membros participa, bem como países participantes, pelo que a cobertura média prevista da população dos países participante é de 53%.

Com vista a este fim, foram propostas actividades e estratégias como promover programas de prevenção de infecções, certificar que os antibióticos são disponibilizados apenas na medicina clínica e veterinária, sempre após a prescrição pelos profissionais de saúde; proibição da utilização de antibióticos como promotores de crescimento na produção animal; desenvolver testes céleres e fiáveis de detecção e susceptibilidade; investimento em campanhas educacionais dirigidas a profissionais e ao público em geral, evitando, pela consciencialização das populações, a utilização excessiva e indevida de agentes antimicrobianos.

Por fim, outra estratégia é encorajar a investigação e desenvolvimento de novos antibióticos, como novas modalidades de prevenção e tratamento de infecções, vacinas e tratamentos alternativos (WHO 1996).

Quanto a este último ponto, os investimentos da indústria farmacêutica em novos antibacterianos têm sido escassos, pelo seu custo (cerca de 500 milhões de euros), constituindo um atraso ao acesso de novos agentes eficazes. Logo, nos últimos anos não tem praticamente existido novas descobertas nas classes de antibióticos, tornando-se necessário e urgente a aplicação de medidas eficazes contra estas resistências (WHOa. 2011).

É neste sentido que este trabalho se insere, onde todos os dados obtidos contribuem para perceber o estado de contaminação das águas balneares no Norte de Portugal, permitindo mais uma vez avaliar a realidade das resistências aos antimicrobianos, para se estabelecer políticas de uso prudente de antibióticos, tanto em prática clínica humana e animal.

CAPÍTULO 2 – OBJECTIVOS

2.1. OBJECTIVOS DO TRABALHO

O estudo da evolução da resistência a antibióticos em bactérias indicadoras de contaminação fecal, como *E. coli*, em diferentes ecossistemas, permitiu detectar variações na resistência a determinados antibióticos ou a emergência de novos mecanismos que as codificam.

Os vários microrganismos e o corpo humano interagem entre si sendo responsáveis pelo bom funcionamento do organismo mas também pela doença.

Todos nós possuímos mecanismos de defesa para permanecermos saudáveis, no entanto, apesar das defesas ainda somos susceptíveis aos agentes patogénicos. O tema deste trabalho aborda a presença de bactérias indicadoras de contaminação fecal em águas costeiras marinhas, bem como o estudo da presença de resistências em isolados bacterianos nesta matriz ambiental.

Para a concretização deste estudo estabeleceram-se objectivos específicos:

- Quantificação de Enterococos e *E.coli* (Decreto Lei 135/2009) nas águas balneares costeiras do Norte de Portugal (Caminha – Espinho).
- Avaliação do perfil de susceptibilidade de *E. coli* a antibacterianos, maioritariamente β -lactâmicos.
- Detecção de β -lactamases de espectro alargado em *E. coli* pelo teste de sinergismo e focagem isoelectrica nas amostras referentes à zona crítica encontrada: as águas balneares costeiras na foz do rio – Praia Árvore – Vila do Conde e as águas interiores do Rio Ave – Vila do Conde.
- Avaliação da capacidade de transferência dos genes codificadores das ESBL's recorrendo a ensaios de conjugação.

Este trabalho contribuirá para aumentar o conhecimento sobre as resistências antimicrobianas existentes em *Enterobacteriaceae*, em águas de rio, que irão desaguar em águas balneares recreativas, que no Verão trazem um número significativo de turistas à região de Vila do Conde. Esta situação também se poderá reflectir nos animais de pasto e produções animais que consomem a água do Rio Ave ou poderá ser devida aos próprios animais.

CAPÍTULO 3 – MATERIAL E MÉTODOS

3.1. ORIGEM DAS AMOSTRAS

As amostras utilizadas neste trabalho foram recolhidas como parte integrante do plano de monitorização das águas balneares do Norte de Portugal. O seu processamento inicial foi efectuado nas instalações do laboratório Equilibrium, e a parte seguinte no laboratório de Microbiologia da Faculdade de Farmácia da UP.

O laboratório Equilibrium é um laboratório de controlo de qualidade de águas e alimentos, acreditado segundo referencial normativo EN ISO/IEC 17025:2005.

As amostragens das praias foram realizadas durante a época balnear 2009, entre o período de 21 de Julho a 15 de Setembro de 2009.

As amostras passaram por duas fases de estudo. Numa primeira fase, avaliou-se a presença e quantificação de *E. coli* e Enterococos, em 78 praias referenciadas pela ARH Norte (Administração da Região Hidrográfica do Norte) desde a praia situada mais a norte, Caminha, até Paramos, a praia mais a sul, pertencente ao concelho de Espinho, como se encontra descrito na figura 7.

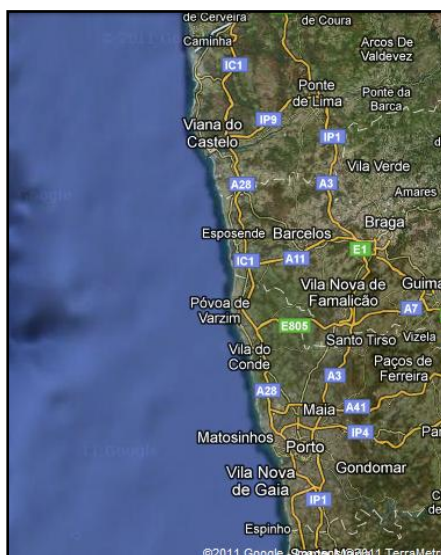
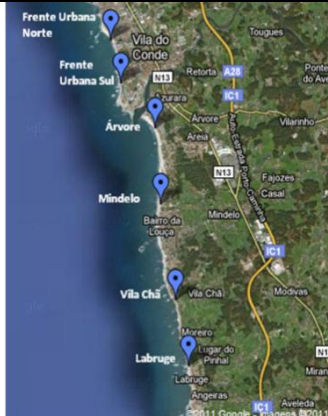


Figura 7. Praias no litoral norte de Portugal, desde o concelho de Caminha, a norte, ao concelho de Espinho.

A partir da primeira fase, avaliou-se a presença de isolados com crescimento em meio com antibiótico pelo que se passou à fase seguinte, a avaliação de susceptibilidade a β -lactâmicos dos isolados de gram negativo seleccionados com antibiótico.

Dado que a segunda parte do trabalho se centrou na zona do concelho de Vila do Conde, abrangendo as águas de mar, águas de rio, solo e fezes de animais, encontra-se descrita, na tabela 6, a localização geográfica das praias do concelho de Vila do Conde. A descrição dos restantes pontos de amostragem encontra-se no anexo I.

Tabela 6. Localização do concelho de Vila do Conde e das praias amostradas.

<i>Concelho de Vila Conde</i>	<i>Praias</i>
	<p>Frente Urbana Norte</p> <p>Frente Urbana Sul</p> <p>Árvore</p> <p>Mindelo</p> <p>Vila Chã</p> <p>Labruge</p>

As amostragens das praias (primeira fase) foram efectuadas com uma periodicidade semanal e quinzenal. Para a zona de Vila do Conde, a amostragem foi realizada com uma periodicidade semanal, como descrito na tabela 7.

Tabela 7. Distribuição das praias com colheitas quinzenais e semanais durante a época balnear, na zona de Vila do Conde.

Concelho	Praia	Semanas														
		Jun 1	Jun 2	Jun 3	Jun 4	Jul 1	Jul 2	Jul 3	Jul 4	Ag 1	Ag 2	Ag 3	Ag 4	Set 1	Set 2	Set 3
Vila Conde	F. Urb. Norte	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
	Frente Urb. Sul	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
	Árvore		✓	✓	✓	Praia Interdita, sem análises										

	Mindelo	v	v	v	v	v	v	v	v	v	v	v	v	v	v	v
	Vila Chã	v	v	v	v	v	v	v	v	v	v	v	v	V	v	V
	Labruge	v	v	v	V	v	v	v	v	v	v	v	v	v	v	V
	Z. Urb. Norte	v	v	v	v	v	v	v	v	v	v	v	v	v	v	v

Nas colheitas da águas de mar efectuadas, foi dada a designação descrita na tabela seguinte:

Tabela 8. Denominação das semanas de amostragem.

<i>Designação</i>	<i>Colheita/semana</i>
A⁻¹	21 Julho
A	28 Julho
B	4 Agosto
C	11 Agosto
D	18 Agosto
E	25 Agosto
F	1 Setembro
G	8 Setembro
H	15 Setembro

Alguns locais de colheita foram alternando ao longo das várias semanas, de acordo com a tabela que se segue (Tabela 9A e Tabela 9B).

Tabela 9. Amostras filtradas para meios com antibiótico, por locais e semana

<i>Semana</i>	<i>A⁻¹</i>	<i>A</i>	<i>B</i>	<i>C</i>
	Vila Praia Âncora	Frente Urb. Norte	Frente Urb. Norte	Frente Urb. Norte
	S. Bartolomeu Mar	Frente Urbana Sul	Frente Urbana Sul	Frente Urbana Sul
	Frente Urb. Norte	Árvore	Árvore	Árvore
	Árvore	Angeiras Norte	Angeiras Norte	Angeiras Norte
	Angeiras Sul	Angeiras Sul	Angeiras Sul	Angeiras Sul
	Labruge	Agudela	Agudela	Funtão
Praias	Frente Azul	Funtão	Funtão	Aterro

	Cabo Mundo	Aterro	Aterro	Leça Palmeira
	Aterro	Leça Palmeira	Leça Palmeira	Leça Sul
	Leça Palmeira	Matosinhos	Matosinhos	Matosinhos
	Matosinhos	Matosinhos Sul	Castelo Queijo	Matosinhos Sul
	Castelo Queijo	Castelo Queijo	Homem Leme	Castelo Queijo
	Homem Leme	Homem Leme	Gondarém	Homem Leme
	Gondarém	Gondarém	Foz	Gondarém
	Foz	Foz	Carneiros	Foz
	Lavadores	S. Félix Marinha	S. Félix Marinha	S. Félix Marinha
	Valadares Sul	Granja		
	S. Félix Marinha	Espinho		
		Paramos		

Tabela 9B. Amostras filtradas para meios com antibiótico, por locais e semana.

<i>Semana</i>	<i>D</i>	<i>E</i>	<i>F</i>	<i>G</i>
	Frente Urb. Norte	Frente Urb. Norte	Frente Urb. Norte	Frente Urb. Norte
	Frente Urbana Sul	Frente Urbana Sul	Frente Urbana Sul	Frente Urbana Sul
	Árvore	Árvore	Árvore	Árvore
	Angeiras Norte	Angeiras Norte	Angeiras Norte	Angeiras Norte
	Aterro	Angeiras Sul	Angeiras Sul	Angeiras Sul
	Leça Palmeira	Aterro	Aterro	Aterro
	Matosinhos	Leça Palmeira	Leça Palmeira	Leça Palmeira
	Castelo Queijo	Matosinhos	Matosinhos	Matosinhos
	Homem Leme	Castelo Queijo	Castelo Queijo	Matosinhos Sul
	Gondarém	Homem Leme	Homem Leme	Castelo Queijo
	Foz	Gondarém	Gondarém	Homem Leme
	S. Félix Marinha	Foz	Foz	Gondarém
		S. Félix Marinha	S. Félix Marinha	Foz
				Granja
				S. Félix Marinha

Com o objectivo de avaliar qual a origem das contaminações obtidas, principalmente da praia da Árvore, considerou-se importante completar este estudo com amostras do Rio Ave, Vila Conde, visto este desaguar nesta praia, local mais contaminado, com elevadas contagens de *E. coli* e Enterococos.

Assim, foi feita a amostragem na praia da Árvore e em três pontos a montante do rio, em Vila Conde - marina, Touguinha e Junqueira, de acordo com a figura 8.

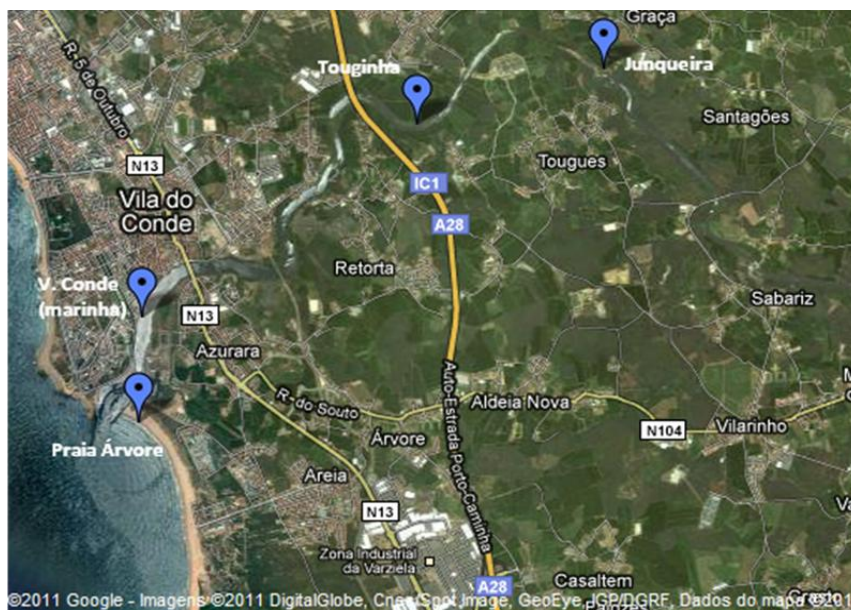


Figura 8. Locais de amostragem no Rio Ave e praia Árvore.

Foi também realizada uma amostragem de água na Serra da Cabreira, Vieira do Minho, perto da nascente do Rio Ave, freguesia de Rossas. Esta amostra permitiu controlar a qualidade inicial da água, de forma a se poder comparar a evolução da contaminação ao longo do rio.

No final do estudo, foram colhidas duas amostras de fezes de bovinos, oriundas de produções animais com terrenos de pasto junto ao rio Ave, na Junqueira e Touguinha, bem como uma amostra do solo da produção em Junqueira.

3.1.1. MÉTODO DE RECOLHA DAS AMOSTRAS

A recolha das amostras das águas balneares costeiras e fluviais foi realizada de acordo com as normas ISO 5667-9 e ISO 19458.

Os recipientes de recolha utilizados eram estéreis, com uma capacidade de 500mL. A cada lote foi testada a sua esterilidade, controlando assim as perfeitas condições dos recipientes.

A colheita foi realizada em pontos essenciais e bem definidos, tendo em conta os locais da praia com maior número de banhistas, e a sua posição relativamente a saídas de águas residuais. As amostras foram recolhidas a 30 cm abaixo da superfície, com o frasco esterilizado. Destapou-se o frasco dentro de água, durante o tempo necessário para a colheita, em que a rolha se conservou na mão, com a parte interior virada para baixo, enchendo de baixo para cima, de forma a evitar contaminações, o mais rapidamente possível, sem preencher totalmente o seu volume. Durante o transporte até ao laboratório, as amostras foram devidamente acondicionadas em arcas térmicas (figura 9), protegidas da luz e a temperatura controlada, entre $5\pm 3^{\circ}\text{C}$ (ISO5667-9 1992; ISO19458 2006).



Figura 9. Material de amostragem. (1) Arca térmica para acondicionamento das amostras; (2) Arcas térmicas de transporte, balde estéril e colete salva vidas.

A recolha da amostra de solo (Figura 10) foi efectuada segundo a ISO 10381-4:2003, em que se considerou um transecto paralelo à linha do rio, subdividindo-se a área a amostrar em 3 pontos equidistantes, recolhendo-se em cada um uma porção de solo, misturando-se as três amostras no mesmo saco constituindo uma amostra composta, representativa da área de estudo. A colheita foi efectuada a uma profundidade entre 5 e 15 cm, utilizando-se luvas estéreis e saco estéril. O transporte

da amostra foi realizado sob refrigeração ($5 \pm 3^\circ\text{C}$), num período inferior a 8 horas, tendo-se dado início à análise num período inferior a 24h.



Figura 10. Ponto de amostragem de solo, numa produção animal situada na margem do rio Ave, Junqueira.

A amostra de fezes foi efectuada nas proximidades do estábulo da produção animal (Figura 11), tendo sido recolhida em saco estéril e utilizando-se luvas estéreis. O transporte da amostra foi realizado sob refrigeração ($5 \pm 3^\circ\text{C}$), num período inferior a 8 horas, tendo-se dado início à análise num período inferior a 24h.



Figura 11. Local de amostragem das fezes dos animais, Touguinha.

3.1.2. METODOLOGIA DE ANÁLISE

3.1.2.1. QUANTIFICAÇÃO DE *ESCHERICHIA COLI* PELA TÉCNICA DA MEMBRANA FILTRANTE, SEGUNDO DECRETO LEI Nº 135/2009, DE 3 DE JUNHO

Neste ponto descreve-se a metodologia realizada para a quantificação de *Escherichia coli*, entendendo-se que os meios utilizados são específicos para bactérias lactose positiva, que são capazes de formar colónias em aerobiose num meio de cultura lactosado diferencial e selectivo, com a produção de ácido a $36\pm 2^{\circ}\text{C}$, em $21\pm 3\text{h}$. A *E. coli* insere-se no grupo, dos coliformes (por ser uma bactéria bacilo gram negativo, lactose positiva, oxidase negativa), particularmente como coliforme fecal, produzindo indol a partir de triptofano a $44\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ durante $21\pm 3\text{h}$.

Após a colheita e acondicionamento das amostras, a análise iniciou-se com a filtração das mesmas. Agitou-se a amostra para filtração de 100 mL, com filtro de porosidade $0,45\ \mu\text{m}$.

Colocou-se a membrana na placa de petri com meio Membrane Lauryl Sulphate Agar (MLSA), tendo em atenção à sua colocação, não ficando com bolhas de ar entre o filtro e o meio. Depois a incubação realizou-se a $44\pm 5^{\circ}\text{C}$, durante $21\pm 3\text{h}$.

Após o tempo de incubação foi feita a contagem das colónias características. Foram consideradas positivas as bactérias lactose positiva, ou seja colónias típicas com coloração amarela, e o meio de cultura que as rodeia, bem como colónias que não viram o meio de cultura, crescendo com cor amarela-alaranjado, sendo consideradas como atípicas.

Para a confirmação de *E. coli*, repicou-se até 5 colónias bem isoladas, atípicas e típicas, para Caldo Triptofano (CT), e incubou-se os tubos a $44\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ a $21\pm 3\text{h}$. Após a sua incubação, adicionou-se Reagente de Kovacs, 0,2 mL aproximadamente, a cada tubo de CT.

Os tubos que apresentaram desenvolvimento de um anel à superfície de cor avermelhada cereja, confirmaram a formação de indol, considerando-se a presença de *E. coli*. Todos os resultados foram expressos em Unidades Formadoras de Colónias por 100 mL da amostra (UFC/100mL) (ISO9308-1:2000 2000; IRARn.º5/2005 2005).

3.1.2.2. QUANTIFICAÇÃO DE ENTEROCOCOS PELA TÉCNICA DA MEMBRANA FILTRANTE, SEGUNDO DECRETO LEI Nº 135/2009, DE 3 DE JUNHO

Após colheita e devidas condições de transporte e acondicionamento, iniciou-se a análise. A metodologia iniciou-se, tal como para *E.coli*, com a filtração de 100 mL de amostra, após agitação, para um filtro de porosidade de 0,45 µm. Colocou-se o filtro na placa de petri com meio Slanetz and Bartley Agar (SBA) e incubou-se em posição invertida a $36\pm 2^{\circ}\text{C}$ durante $44\pm 4\text{h}$.

Após o tempo de incubação, procedeu-se à contagem de colónias características, que apresentam coloração vermelha, rosa ou castanha.

O procedimento de confirmação foi realizado com o meio Bilis Esculina Azida Agar (BEA), em que as placas foram pré-aquecidas a 44°C . As membranas, que já tinham sido incubadas em SBA, foram transferidas para este meio (BEA). Tornou-se a incubar a 44°C , durante 2 horas, a partir das quais se fez a leitura imediata.

As colónias que apresentaram e produziram um enegrecimento do meio de cultura foram consideradas como positivas pela formação da esculetina. Todos os resultados foram apresentados na forma de Unidade Formadoras de Colónias por 100 mL de amostra (UFC/100 mL) (ISO7899-2 2000).

3.1.3. ANÁLISE DE SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIBACTERIANOS DOS ISOLADOS DE GRAM NEGATIVO SELECCIONADOS

Nesta análise procedeu-se à preparação de três tipos de meio com antibióticos, nomeadamente, McConkey (MC) com Cefotaxima (CTX); McConkey (MC) com Aztreonamo (ATM); e McConkey (MC) com Meropenemo (MER), todos com uma concentração de antibiótico de 1 µg/mL.

Utilizou-se o meio de McConkey por ser um meio selectivo e diferencial que permitiu isolar as bactérias de Gram negativo, pela presença de sais biliares, bem como a diferenciação dos bacilos Gram negativos fermentadores da lactose dos não fermentadores, pela presença do indicador vermelho neutro.

Após agitação da amostra filtrou-se 50 mL para cada uma das placas de petri com meio MC+CTX e MC+ATM. Para o meio de MC com meropenemo, filtrou-se 100 mL de amostra, aumentando a probabilidade de isolamento de bactérias resistentes aos carbapenemos.

As placas foram incubadas a $36\pm 2^{\circ}\text{C}$, durante 24h.

Das colónias características que cresceram, rosa mucóides, foram repicadas 3 a 5, novamente para meio com o respectivo antibiótico. Das colónias características e bem isoladas, realizou-se o antibiograma.

3.1.4. ANÁLISE MICROBIOLÓGICA EM AMOSTRA DE SOLO

A amostra foi colhida em saco estéril, com massa suficiente. Foram utilizadas 10g de amostra que foram diluídas em 95 mL de soro fisiológico, agitando depois vigorosamente durante 1 min.

Desta suspensão inicial retirou-se 1 mL para 9 mL de soro fisiológico estéril. Por se tratar de uma matriz muito densa, foram feitas cinco diluições, até à 10^{-6} .

Foram depois inoculadas por espalhamento as três últimas diluições para meio MC selectivo com CTX, ATM e MER, nas mesmas concentrações que se utilizou anteriormente.

Foram repicadas 3 a 5 colónias características, fermentadoras de lactose, novamente para o meio selectivo (MC+CTX ou MC+ATM ou MC+MER) e após obtenção de uma cultura pura, realizou-se o respectivo antibiograma.

3.1.5. ANÁLISE MICROBIOLÓGICA EM AMOSTRAS DE FEZES DE BOVINO

As amostras de fezes foram acondicionadas em sacos estéreis, com refrigeração durante o transporte.

Foi transferido cerca de 2 a 3g de cada amostra para um tubo falcon estéril com 40 mL de Brain Heart Infusion (BHI) e inoculado a 37°C durante 24h, para potenciar o crescimento das bactérias. Após o tempo de incubação, foi semeado 100

µL do sobrenadante em MC+CTX e MC+ATM, com concentração de cada antibiótico de 1 µg/mL. O mesmo procedimento foi realizado para o sedimento resultante.

Foram repicadas 3 a 5 colónias características novamente para o meio selectivo (MC+CTX ou MC+ATM) e após obtenção de uma cultura pura, foi feito o respectivo antibiograma.

3.2. ENSAIOS DE SUSCEPTIBILIDADE A AGENTES ANTIMICROBIANOS

O estudo de susceptibilidade aos antibióticos foi executado em todos os isolados seleccionados obtidos da filtração das amostras para meio suplementado com antibiótico, a partir dos quais foram seleccionadas 3 a 5 colónias (UFC), características de *Enterobacteriaceae*, pelo método de difusão em agar com discos, segundo as normas da CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute 2009).

Foi realizada uma suspensão bacteriana, em tubos de soro fisiológico estéril, com densidade óptica de 0,5 escala de MacFarland, sendo depois semeado em meio Mueller Hinton (MH).

Após o ajuste da turvação, utilizou-se uma zaragatoa estéril para inocular a placa, executando-se um estriado completo em toda a placa, rodando três vezes a 60 graus, ficando garantida uma distribuição uniforme do inóculo.

Foram colocados discos impregnados com antibiótico, à superfície do meio de cultura, em concentrações definidas pelas normas anteriormente citadas. Na adição destes, garantiu-se que os discos estava plenamente em contacto com a superfície do meio e que não houve trocas de lugar dos discos, pois existem antibióticos que se difundem quase instantaneamente ao entrarem em contacto com o agar.

Utilizaram-se dez agentes antimicrobianos: ampicilina (AMP 10 µg/mL), ácido nalidíxico (NA 30 µg/mL), cefuroxima (CXM 30 µg/mL), cefotaxima (CTX 30 µg/mL), cefoxitina (FOX 30 µg/mL), ceftazidima (CAZ 30 µg/mL), imipenemo (IPM 10 µg/mL), aztreonamo (ATM 30 µg/mL), cefepime (FEP 30 µg/mL), amoxicilina+ácido clavulânico (AMC 20+10 µg/mL) para se estudar o comportamento das estirpes isoladas nos diferentes meios com antibiótico.

As placas foram incubadas a 37°C durante 24h.

Passado o tempo de incubação mediu-se com o auxílio da craveira os halos de inibição à volta dos discos. De acordo com o tamanho dos halos representados, as bactérias foram classificadas como Susceptíveis (S), com resistência Intermédia (I) e Resistentes (R), conforme descrito na tabela 10. Os resultados foram analisados de acordo com os padrões de resistência e sensibilidade apresentados.

Tabela 10. Antibióticos utilizados e critérios de avaliação de acordo com Clinical Laboratory Standards Institute (Clinical and Laboratory Standards Institute 2009), pela metodologia de difusão de discos.

<u>Classe</u>	<u>Antibiótico</u>	<u>Abreviatura</u>	<u>Disco</u>	<u>Diâmetro</u>		
<u>Antibiótico</u>			(µg)		(mm)	
				S	I	R
Penicilina	Ampicilina	AMP	10	≥17	14-16	≤13
Penicilina associada	Amoxicilina/Ác. Clav.	AMC	20/10	≥18	14-17	≤13
Cefalosporina 2 ^a geração	Cefuroxima	CXM	30	≥18	15-17	≤14
Cefalosporina 3 ^a geração	Cefotaxima	CTX	30	≥23	15-22	≤14
Cefalosporina 3 ^a geração	Ceftazidima	CAZ	30	≥18	15-17	≤14
Monobactâmico	Aztreonamo	ATM	30	≥22	16-21	≤15
Carbapenemo	Imipenemo	IPM	10	≥16	14-15	≤13
Cefalosporina 2 ^a geração	Cefoxitina	FOX	30	≥18	15-17	≤14
Quinolona	Ácido Nalidíxico	NA	30	≥19	14-18	≤13
Cefalosporina 4 ^a geração	Cefepima	FEP	30	≥18	15-17	≤14

A partir da obtenção do antibiograma e diâmetro dos halos, os isolados de interesse foram submetidos posteriormente a três abordagens, nomeadamente o teste de sinergismo, a focagem isoelectrica e a conjugação.

3.3. CONSERVAÇÃO DAS ESTIRPES

É de extrema importância uma boa metodologia de conservação dos isolados para posterior utilização. A maioria das culturas pode ser mantidas em sub-cultivo. No entanto, para agilizar o trabalho laboratorial, estas podem ser mantidas em criotubos ou eppendorf. A conservação de todos os isolados obtidos no decorrer do trabalho prático, foi realizada a partir do isolamento em MH, a partir do qual as estirpes foram preservadas em 1 mL de TSB e glicerol (30%, p/v, concentração final), a -80°C.

Aquando da reutilização dos isolados, retira-se um pouco da cultura pura, com uma ansa estéril e inoculação por método de riscado, numa placa de Petri com o meio de cultura adequado.

3.4. CARACTERIZAÇÃO DOS ISOLADOS

3.4.1. PROVAS BIOQUÍMICAS

Para a identificação dos microrganismos em estudo, recorreremos às provas bioquímicas tradicionais, como provas do metabolismo respiratório e proteico.

Prova do Citrato

Esta prova permitiu diferenciar os microrganismos isolados de acordo com a sua capacidade de utilizar o citrato de sódio como única fonte de carbono na produção de energia. É utilizado o meio agar Citrato de Simmons e, no caso de a bactéria conter citrato permease, este vai auxiliar o transporte do citrato para o seu interior, onde vai ser degradado pela enzima citrase, resultado oxalacetato e acetato que são convertidos enzimaticamente em ácido pirúvico e dióxido de carbono. Com a libertação CO₂, vai ocorrer reacção com os iões de sódio, produzindo carbonato de sódio, subindo o pH do meio. Com a presença do indicador, o meio torna-se azul. Se o microrganismo em causa não utilizar o citrato como fonte de carbono, o meio mantém a cor original verde.

Prova da Ureia

Nesta prova pretende-se averiguar se o microrganismo possui a enzima que degrada a ureia, a urease, uma enzima hidrolítica que permite degradá-la em duas moléculas de amónio e uma de dióxido de carbono. O meio utilizado é o Ureia Agar. No caso de a prova ser positiva, obtêm-se produtos finais da reacção que, com a presença de vermelho de fenol no meio, torna-se rosa. Se mantiver a cor inicial, alaranjado, não ocorreu a degradação da ureia.

Prova MR-VP

Esta prova tem como objectivo determinar a capacidade dos microrganismos para oxidar a glicose com a produção e manutenção de concentrações altas de produtos finais ácidos. Utilizam-se os meios Methyl Red (MR) e Voges – Proskauer (VP). O indicador de pH, vermelho de metilo, no primeiro meio, vai detectar a presença de grandes concentrações de produtos finais ácidos, pois tem um ponto de viragem baixo. Assim, a pH 4, o vermelho de metilo vira para cor vermelha, o que indica uma reacção positiva, com fermentação ácido mista, enquanto que a pH é 6, o indicador muda para amarelo e sendo a prova negativa, pela fermentação do butanodiol.

No teste VP, o objectivo é determinar a capacidade dos microrganismos produzirem produtos finais não ácidos ou neutros, a partir dos ácidos orgânicos que resultam da metabolização da glicose. A adição do reagente de Barritt's (solução 10% KOH e α -naftol) permite detectar a presença de acetilmetilcarbinol (acetoína) que é um precursor da síntese de 2,3 butanediol, pois ocorre a formação de um complexo rosa/vermelho que dá essa cor ao meio de cultura.

O desenvolvimento de uma cor rosa/vermelha na cultura, 15 minutos após a adição do reagente de Barritt's representa uma prova positiva, utilizando o microrganismo a glucose por via do butanodiol. A ausência dessa cor, mantendo a cor cobre, é uma prova negativa, sendo que a glucose é utilizada pela via ácido mista.

Prova SIM

Esta prova pretende avaliar três características bacterianas, a produção de H_2S , a mobilidade do microrganismo e a produção de indol. Na detecção de H_2S , o sulfato de ferro presente no meio, inicialmente incolor, serve como indicador, pois o ferro vai formar com o H_2S sulfureto de ferro, formando um precipitado negro, ao longo da linha de inoculação, sendo a reacção positiva. Não havendo alteração de cor, o teste é negativo.

Esta avalia também a presença ou ausência de mobilidade das bactérias, pelas características do meio semi-sólido. O teste da produção de indol é realizado com a adição do reagente de Kovacs, formando, em caso positivo, um anel de cor cereja e, no caso da persistência da coloração amarela do reagente, indica uma reacção negativa, demonstrando que o substrato triptofano não foi hidrolisado para indol, como foi anteriormente referido.

A utilização destas provas bioquímicas permitiu diferenciar os principais grupos de *Enterobacteriaceae*, pois basearam-se em propriedades bioquímicas e nas reacções enzimáticas na presença de substratos específicos.

3.4.2. CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA PELO API 20E

Após as provas tradicionais, os isolados característicos pertencentes às *Enterobacteriaceae*, foram identificados pelo sistema de biotipificação numérico API 20E (bioMérieux 20100) para isolados.

Esta metodologia é considerada uma variante das provas bioquímicas, usada para identificar *Enterobacteriaceae* e outros bacilos Gram negativos. É um sistema de 20 microtubos individualizados, em que cada um contém um meio de cultura desidratado. Os meios forma hidratados aquando da inoculação da suspensão dos microrganismos, em soro fisiológico que corresponde 0,5 na escala de MacFarland (NaCl 0,85%). O procedimento foi o definido pelo fabricante.

Os resultados são lidos no leitor automático, através da alteração da cor dos meios de cultura, directamente ou através da adição de reagentes.

3.4.3. TESTE DE SINERGISMO

Este teste denominado de DDST, Double Disc Synergy Test, tem como principal objectivo a identificação de estirpes produtoras de ESBL's pela visualização de fenómenos de sinergismo. Estes fenómenos caracterizam-se por um aumento nos halos de inibição dos discos impregnados com cefalosporinas de largo espectro e aztreonamo, ou o aparecimento de zonas de inibição de crescimento, entre halos de oximino- β -lactâmicos, pela influência do ácido clavulânico (Jarlier 1988).

A confirmação da presença de sinergismos no antibiograma, entre discos de antibióticos, foi realizada com a comparação de um disco do respectivo antibiótico e com outro disco em que se adicionou ácido clavulânico ao antibiótico em estudo.

Adicionou-se aos discos com os antibióticos em estudo (Ceftazidima e Cefotaxima), 10 μ L de solução de ácido clavulânico 1 mg/mL, deixando secar 30 min a 1h, antes da sua aplicação em MH, a uma distância de 20 a 30 mm entre eles, de acordo com o CLSI.

À placa de petri com o isolado que pretendíamos confirmar a presença de sinergismo e de ESBL, colocou-se de um lado o disco original e no outro o disco com o antibiótico + ácido clavulânico, seguido de incubação a 37°C, durante 18h (Clinical and Laboratory Standards Institute 2009). No caso da presença de β -lactamases de espectro alargado, a diferença do halo entre os dois discos deverá ter uma variação de 5 mm, para o halo do disco com antibiótico + ácido clavulânico (Clinical and Laboratory Standards Institute 2009).

3.4.4. FOCAGEM ISOELÉCTRICA

A preparação para a focagem isoelétrica envolve a produção de extractos brutos dos isolados, em que se extraíram as β -lactamases do espaço periplasmático, para se poder determinar o seu ponto Isoelétrico (pI).

Ao isolado em questão, e adicionou-se 40 mL de TSB e o disco de antibiótico respectivo (Cefotaxima ou Aztreonamo). Inoculou-se os tubos a 37°C, durante 24h. Após o tempo de incubação centrifugou-se a 5000 rotações, durante 15min.

Fez-se nova centrifugação, rejeitando o sobrenadante e adicionando-se 20 mL água estéril, obtendo-se um pellet ou sedimento, com o mínimo de água-sobrenadante possível.

Colocaram-se de seguida os extractos obtidos em eppendorfs, para se submeterem a choques térmicos, em 5 pulsos de congelação a -80°C e aquecimento a 37°C .

Por fim, testou-se a força do extracto, utilizando 5 μL deste e 5 μL de nitrocefin, verificando com o cronómetro se, entre 0 a 10 seg, existe alteração de cor. A modificação da cor original do nitrocefin altera de laranja claro para laranja muito escuro-castanho, aquando da presença de β -lactamases. Quando tal se verificou, congelou-se os extractos a -80°C . Esta cefalosporina cromogénica permite a detecção qualitativa das β -lactamases, pela reacção do substrato, a nitrocefina, com a β -lactamase presente no isolado.

Na metodologia da focagem isoeléctrica foi utilizado o padrão com pI's de 5.4, 5.6, 7.3, 7.6, 8.2.

3.4.5. CONJUGAÇÃO

O ensaio de conjugação foi realizado em três isolados (isolado AterroATMD1, Árv1ACTX e Junqueira4AATM), de modo a estudar a transferência de resistência ao antibiótico Cefotaxima.

Como estirpe receptora usou-se como cultura pura de *E. coli* K802N, não fermentadora de lactose, desprovida de plasmídeos e resistente ao ácido nalidíxico.

As bactérias em estudo, denominadas dadoras, e as bactérias receptoras foram inoculadas em 10 mL de caldo Trypticase Soy Broth (TSB) e incubadas a 37°C , durante 18h.

No caldo das dadoras correspondentes aos ensaios de conjugação, colocou-se um disco CTX, como pressão selectiva para promover a expressão do gene codificador de β -lactamase.

As bactérias dadoras e receptoras foram colocadas em meio de MH, 100 μL da estirpe receptora e sobre esta 100 μL da estirpe dadora, em que após o tempo de

incubação 37°C, durante 18h, se suspendeu em 1 mL de soro fisiológico estéril. Foram depois espalhados 100 µL desta suspensão em placas de McConkey selectivo, contendo 500 µL/mL de NA e 2 µg/mL de CTX.

Posteriormente as placas foram incubadas a 37°C, durante 24h. Das colónias obtidas foi realizado de novo o antibiograma com os disco de Ceftazidima, Cefotaxima, Ácido nalidíxico e Amoxicilina + Ácido clavulânico.

3.5. CONTROLO QUALIDADE

Durante o processo de realização dos ensaios, todos os meios de cultura foram submetidos a um Controlo de Qualidade rigoroso.

Por cada lote de meio preparado (lote equivalente a uma esterilização em autoclave de meios de cultura), descrito na tabela 11, foi realizado um controlo segundo a norma ISO/TS 11133-2, nomeadamente, controlo do pH, controlo negativo, controlo positivo, esterilidade e ensaio de produtividade (ISO/TS11133-2:2003/Amd1 2011).

Tabela 11. Controlo de qualidade associado aos meios de cultura utilizados nos ensaios.

Meio utilizado		Lote	Validade	Conservação
Membrane Lauryl Sulphate Agar (MLSA)		L120A, L121A, L130A	1 mês/placa	5±3°C
Slanetz and Bartley Agar (SBA)		L111A, L134A, L141A	2 semanas/placa	5±3°C
Bilis Esculina Azida Agar (BEA)		L136A	6 meses/frasco	5±3°C
Mueller Hinton Agar (MH)		L3, L5, L6, L9	1 mês/placa	5±3°C
McConkey Agar	+ cefotaxima (CTX) 1µg/mL	L1, L2, L3, L4, L5, L6, L7, L8, L9	1 mês/placa	5±3°C
	+ aztreonamo (ATM) 1µg/mL	L1, L2, L3, L4, L5, L6, L7, L8, L9	1 mês/placa	5±3°C
	+ meropenemo (MER) 1µg/mL	L1, L2, L3, L4, L5, L6, L7, L8, L9	1 mês/placa	5±3°C

De igual forma, realizou-se o controlo da água desionizada utilizada na preparação do meio de cultura e o controlo da temperatura e tempo de esterilização da autoclave através de termómetro calibrado (datalogger, utilizado em contínuo durante todo o ciclo de esterilização) e da utilização do controlo biológico (*Geobacillus stearothermophilus*).

No caso específico dos meios com suplemento de antibióticos, para além da esterilidade, foi efectuado um controlo negativo, com a estirpe *E. coli* ATCC 25922. Esta estirpe tem características e comportamentos bem definidos, catalogados e identificados até à espécie.

As estirpes utilizadas para o controlo positivo e negativo encontram-se descritos na tabela 12, de acordo com as características dos meios de cultura.

Tabela 12. Estirpes utilizadas no Controlo de Qualidade, de acordo com as características dos meios de cultura.

Meio utilizado		Controlo	
		Positivo	Negativo
Membrane Lauryl Sulphate Agar (MLSA)		<i>E. coli</i> (colónias amarelas e meio amarelo)	<i>Enterococcus faecalis</i> (não há crescimento)
Caldo Triptofano (CT)		<i>E. coli</i> (anel vermelho cereja após adição de Kovacs)	<i>Enterococcus faecalis</i> (anel da cor do reagente - amarelo após adição de Kovacs)
Slanetz and Bartley Agar (SBA)		<i>Enterococcus faecalis</i> (colónias vermelho, rosa, castanho)	<i>E. coli</i> (não há crescimento)
Bilis Esculina Azida Agar (BEA)		<i>Enterococcus faecalis</i> (halo negro)	-
McConkey Agar	+ cefotaxima (CTX) 1µg/mL	-	<i>E.coli</i> 25922 ATCC (não há crescimento)
	+ aztreonam (ATM) 1µg/mL	-	<i>E.coli</i> 25922 ATCC (não há crescimento)
	+ meropenemo (MER) 1µg/mL	-	<i>E.coli</i> 25922 ATCC (não há crescimento)

Durante todo o período analítico foi realizado o Controlo do Ar Ambiente, para despiste de eventuais contaminações. Foi realizado em cada série de filtrações, o controlo do ar ambiente através da exposição de duas placas com meio de cultura Water Plate Count Agar (WPCA), durante 15 minutos, sendo quantificados os microrganismos a 22°C durante 72 horas.

CAPÍTULO 4 – RESULTADOS

No presente estudo foram recolhidas e analisadas 756 amostras de águas provenientes de 79 praias, relativas aos concelhos de Caminha, Viana do Castelo, Esposende, Póvoa do Varzim, Vila do Conde, Matosinhos, Porto, Vila Nova de Gaia e Espinho.

Nestas amostras foi possível obter 538 isolados fermentadores de lactose, a partir de meio selectivo com antibiótico, os quais deram origem a 42 antibiogramas.

Também se realizou uma amostragem e respectiva análise de solo e fezes de bovinos.

4.1. AMOSTRAGEM

Todo o processo de recolha de amostras de águas do mar segundo as normas aplicáveis, ISO 19458:2006, decorreu de acordo com os procedimentos, não se tendo verificado nenhuma situação anormal de amostragem.

As condições climáticas mantiveram-se constantes ao longo do período de amostragem. Não foi detectado aspecto visual anormal nomeadamente a presença de óleos minerais, substâncias tensioactivas e fenóis.

Relativamente à amostragem no rio Ave, foi notado o aparecimento de jacintos de água, na Praia da Árvore, e crescimento excessivo na foz do rio e ao longo das margens, até à Junqueira, local da última colheita (Figura 12).



Figura 12. Locais de amostragem com presença ou crescimento excessivo de jacintos. **A-** Praia Árvore; **B-** marinha Vila Conde, foz do rio Ave; **C-** Touguinha, a montante do rio.

Aquando da colheita das fezes e solo, foram notados odores desagradáveis ocasionais, oriundos de vários locais de descarga de efluentes, ao longo do caminho percorrido (Figura 13).



Figura 13. Local de descarga de efluentes ao longo dos campos de pasto, que vão desaguar ao Rio Ave.

Decorrente da constatação da existência de odores desagradáveis e da sua provável origem, bem como a possível eutrofização indicada pelos jacintos, no período de amostragem, justificou o estudo a montante da foz do rio Ave, após a zona urbana de Vila do Conde.

Com a libertação dos jacintos devido à corrente, ocorreu movimentação das águas e resíduos, desaguardo na foz do rio, afectando a praia da Árvore.

4.2. ANÁLISE MICROBIOLÓGICA SEGUNDO DECRETO LEI 135/2009, DE 3 DE JUNHO

Os resultados obtidos na análise microbiológica inicial para quantificação de *E.coli* (UCF/100 mL) encontram-se descritos no anexo III.

Os gráficos referentes aos resultados de *E. coli*, encontram-se descritos por concelho, onde se relacionou o número de unidades formadoras de colónias, por 100 mL, durante as semanas de amostragem, por concelho.

Verificou-se que no concelho de Caminha as praias em que se obteve maiores contagens de *E. coli* foram nas praias de Vila Praia de Âncora e Moledo. Na praia de Vila Praia de Âncora verificou-se um aumento nas contagens na segunda semana de Junho, crescendo novamente no final de Agosto e início de Setembro. Quanto aos resultados da Praia de Moledo obtiveram-se os valores mais elevados na segunda semana de Agosto (Figura 14).

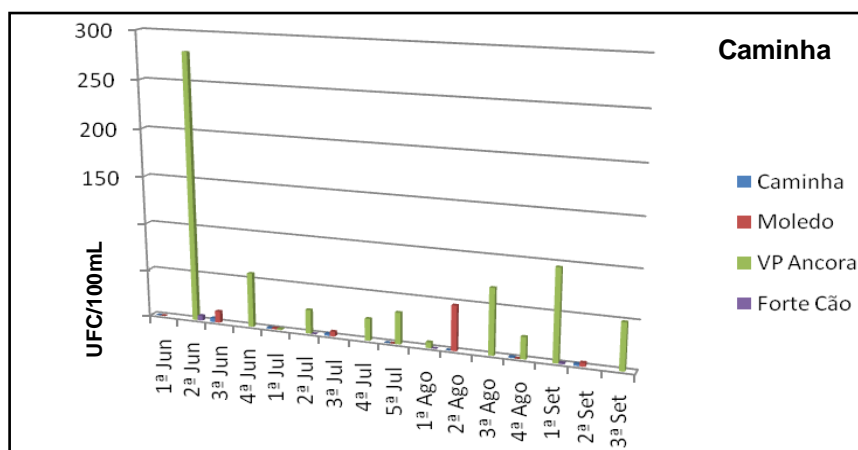


Figura 14. Resultados obtidos na quantificação de *E. coli*, em amostras de águas balneares, no concelho de Caminha.

No concelho de Viana do Castelo, verificou-se na praia do Cabedelo uma possível contaminação das águas na primeira semana de Junho, pois os restantes resultados até ao fim da época balnear foram muito reduzidos ou nulos. Também na praia do Norte, se verificou na última semana de Agosto um aumento, 63 UFC/100 mL. Os restantes locais de amostragem revelaram uma carga microbiana muito reduzida (Figura 15).

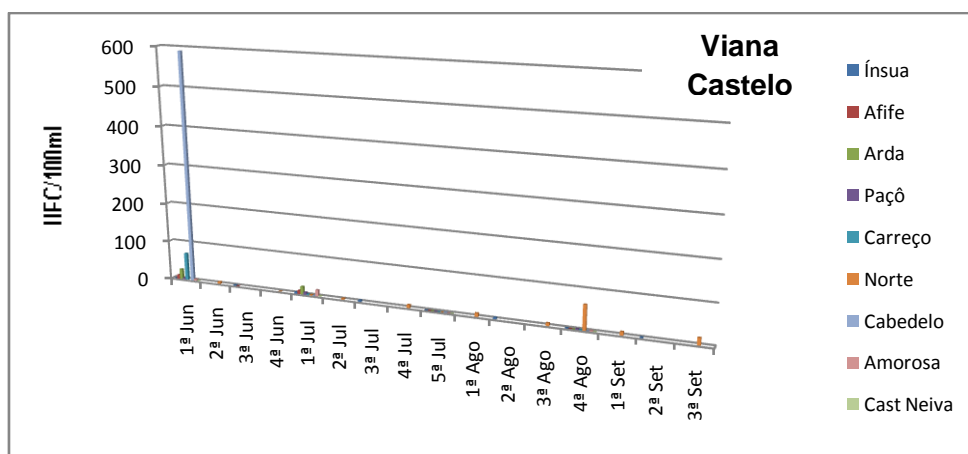


Figura 15. Resultados obtidos na quantificação de *E. coli*, em amostras de águas balneares, no concelho de Viana do Castelo.

Relativamente ao concelho de Esposende, a maioria das praias teve crescimento nulo, ou reduzido, exceptuando as praias de Suave Mar, Marinhas e Rio de Moinhos, na segunda semana de Junho, com, respectivamente 2800, 270 e 90 UFC/100 mL. Também na última semana de Julho e penúltima de Agosto, ocorreu crescimento mais elevado novamente em Rio de Moinhos e Suave Mar (Figura 16).

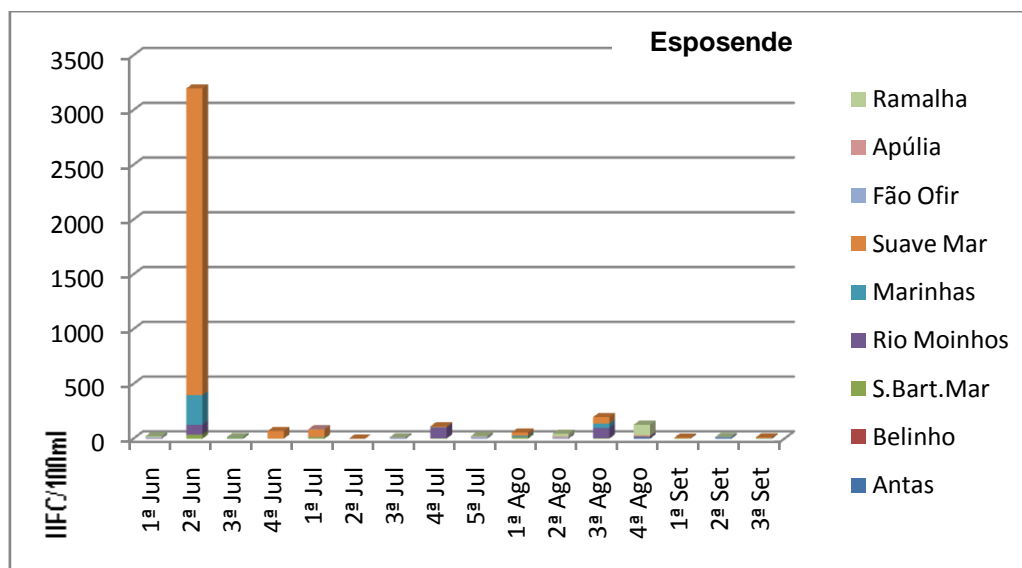


Figura 16. Resultados obtidos na quantificação de *E.coli*, em amostras de águas balneares, no concelho de Esposende.

No concelho da Póvoa do Varzim, verificou-se crescimento de *E. coli* na maioria das amostragens, nas praias de Fragosa, Lagoa e Zona Urbana Norte, atingindo valores mais elevados na segunda semana de Junho e na quarta semana de Julho. Na praia de Quião quantificou-se 210 UFC/100 mL na primeira semana de Setembro, sendo um resultado elevado e fora do normal, de acordo com os resultados das amostragens anteriores (Figura 17).

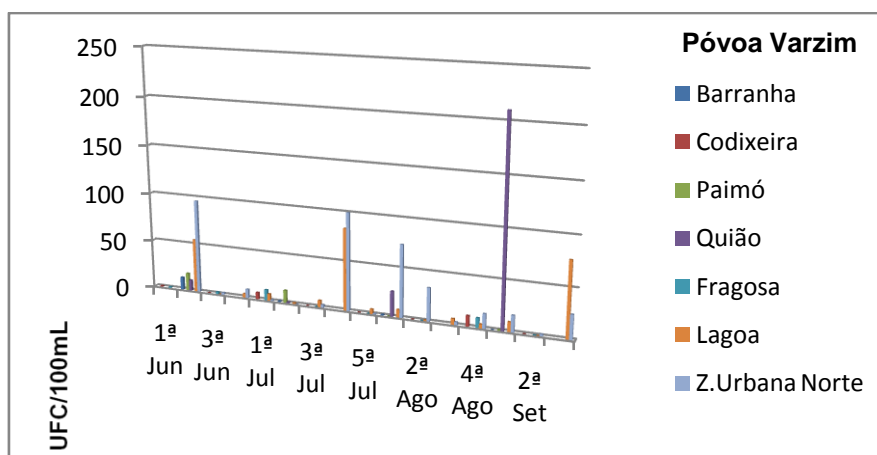


Figura 17. Resultados obtidos na quantificação de *E.coli*, em amostras de águas balneares, no concelho da Póvoa do Varzim.

Já no concelho de Vila do Conde, as contagens são mais elevadas em todas as praias, comparativamente com os concelhos a norte. A praia do Mindelo é a praia do concelho com maior número de contagens de *E.coli* e a praia de Vila Chã e Labruge são as praias com menos contaminação. A praia da Árvore tem colheitas até à primeira semana de Julho, pelo que, a partir dessa data não se fez mais amostragens pelo facto da praia estar interdita (Figura 18).

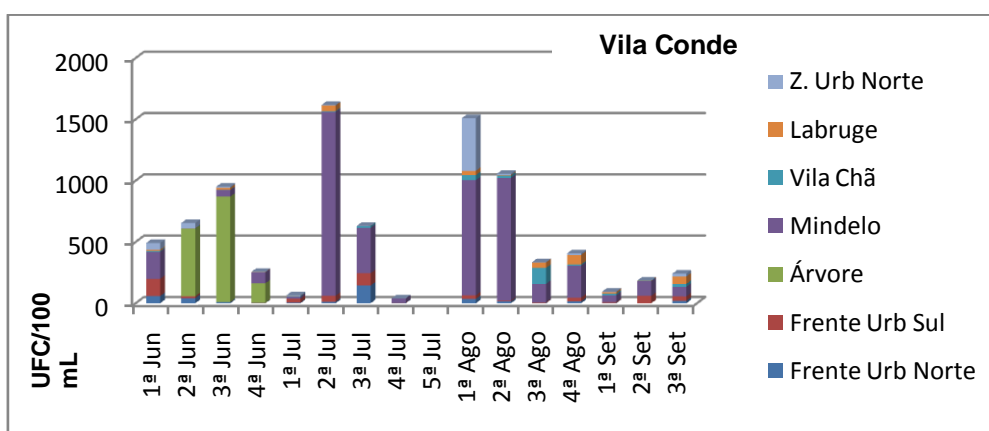


Figura 18. Resultados obtidos na quantificação de *E.coli*, em amostras de águas balneares, no concelho de Vila do Conde.

No concelho de Matosinhos a praia com maior contagem é a de Angeiras Norte, obtendo-se um pico na primeira semana de Julho e a praia de Matosinhos (no gráfico a cor rosa), com grande crescimento no início das amostragens, na segunda semana de Junho.

Ao longo da época balnear os valores estiveram relativamente baixos, principalmente na praia da Memória, na qual não se obteve contagem de *E. coli*, excepto na segunda semana de Junho e na segunda semana de Julho (Figura 19).

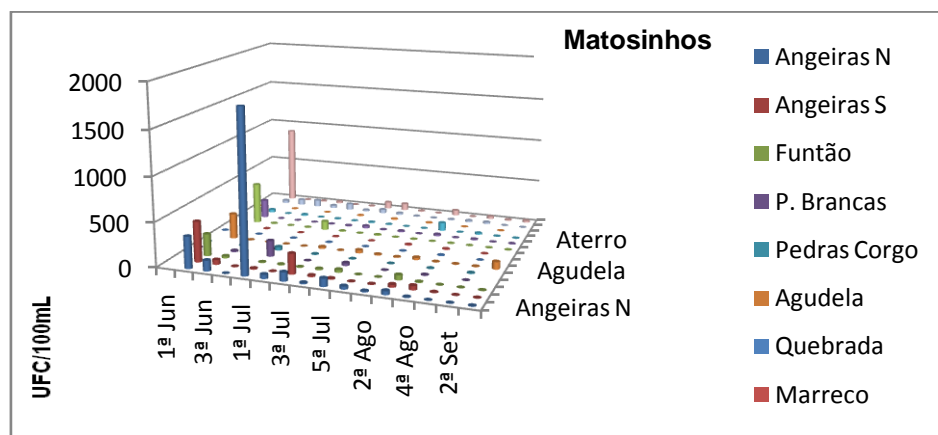


Figura 19. Resultados obtidos na quantificação de *E. coli*, em amostras de águas balneares, no concelho de Matosinhos.

Na zona do Porto, a praia do Castelo do Queijo obteve sempre elevadas contagens ao longo de toda a época balnear, atingindo um pico na segunda semana de Junho. Ao longo da época balnear os valores estiveram relativamente baixos, principalmente na praia da Memória, na qual não se obteve contagem de *E. coli*, excepto na segunda semana de Junho e na segunda semana de Julho. As praias da Foz e Homem de Leme, são as praias do concelho do Porto que têm menor percentagem de contagens de *E. coli* (Figura 20).

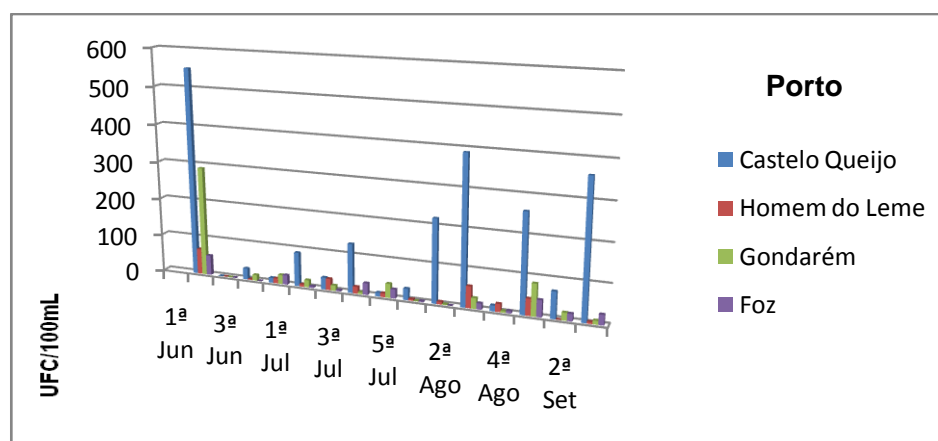


Figura 20. Resultados obtidos na quantificação de *E. coli*, em amostras de águas balneares, no concelho do Porto.

No concelho de Vila Nova de Gaia verificou-se resultados muito baixos, excepto na praia mais a sul do concelho, Praia de S. Félix da Marinha, que obteve elevadas contagens de *E. coli* na segunda semana de Junho e na quarta de Julho. As restantes praias obtiveram resultados bastantes abaixo da médias das praias dos concelhos anteriores (Figura 21).

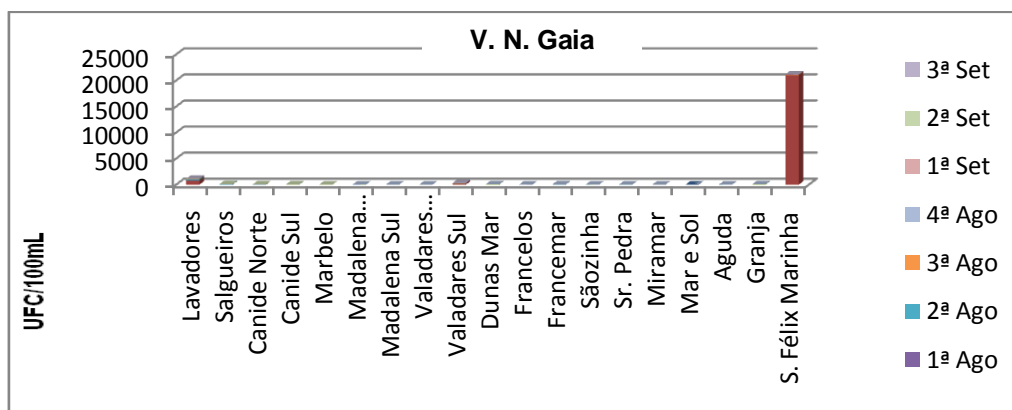


Figura 21. Resultados obtidos na quantificação de *E. coli*, em amostras de águas balneares, no concelho de Vila Nova de Gaia.

Relativamente às praias do concelho de Espinho, a praia de Silvade obteve contagens nulas nas primeiras semanas de amostragens, aumentando drasticamente a partir da segunda semana de Julho. Já a praia Frente Azul e Seca, que tiveram um pico de contaminação de *E. coli*, na segunda semana de Julho, diminuíram substancialmente os valores obtidos (Figura 22).

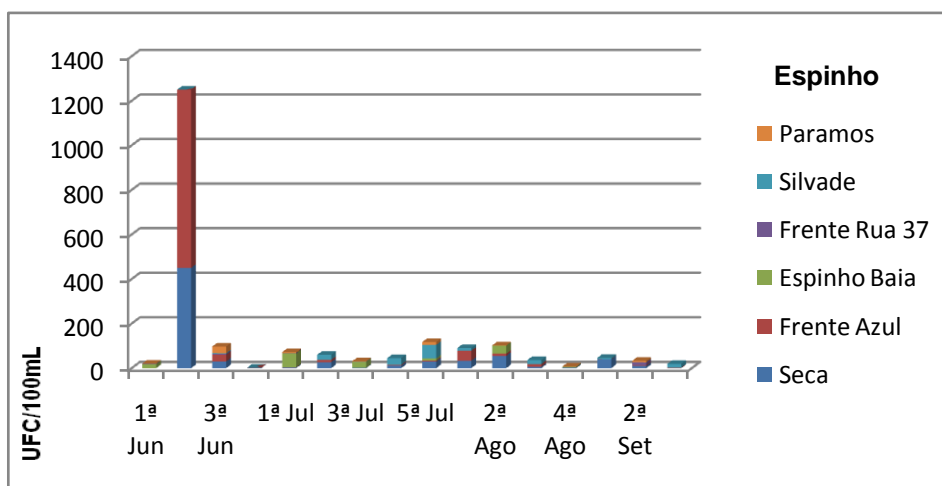


Figura 22. Resultados obtidos na quantificação de *E. coli*, em amostras de águas balneares, no concelho de Espinho

Os resultados obtidos na análise microbiológica inicial para quantificação de **Enterococos** (UFC/100 mL), encontram-se descritos no anexo II.

Os gráficos referentes aos resultados de *Enterococos*, encontram-se descritos por concelho, onde se relacionou o número de unidades formadoras de colónias, por 100 mL, durante as semanas de amostragem, por concelho.

No concelho mais a Norte do país, Caminha, verificou-se que na praia Forte do Cão se obteve ao longo da época balnear contagens nulas ou muito baixas de Enterococos, bem como na praia de Caminha, excepto na terceira semana de Julho. A praia de Vila Praia de Âncora obteve sempre contagens, excepto na primeira semana de Julho e a praia de Moledo atingiu um máximo na segunda semana de Agosto com 28 UFC/100 mL (Figura 23).

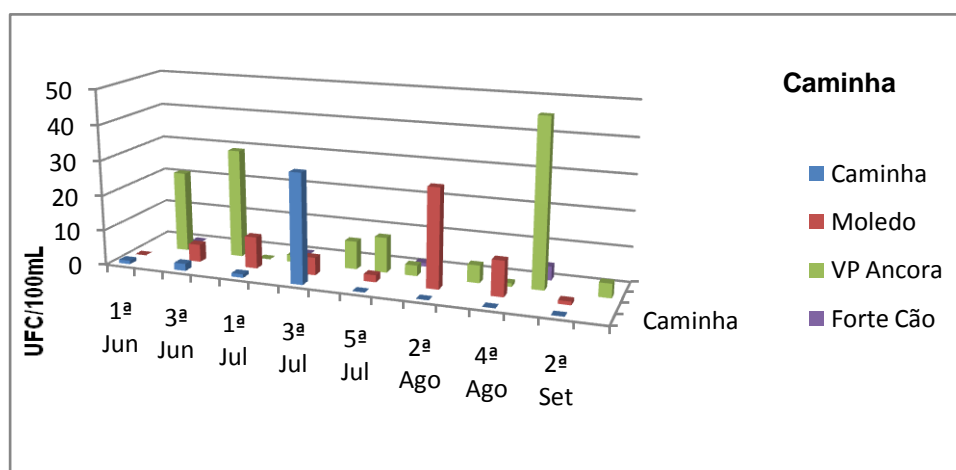


Figura 23. Resultados obtidos na quantificação de Enterococos, em amostras de águas balneares, no concelho de Caminha.

Verificou-se no concelho de Viana do Castelo elevadas contagens na primeira semana de Julho, na maioria das praias amostradas, sendo Carreço a praia com maior quantificação de Enterococos. A praia Norte foi monitorizada todas as semanas durante a época balnear, e obteve bons resultados (Figura 24).

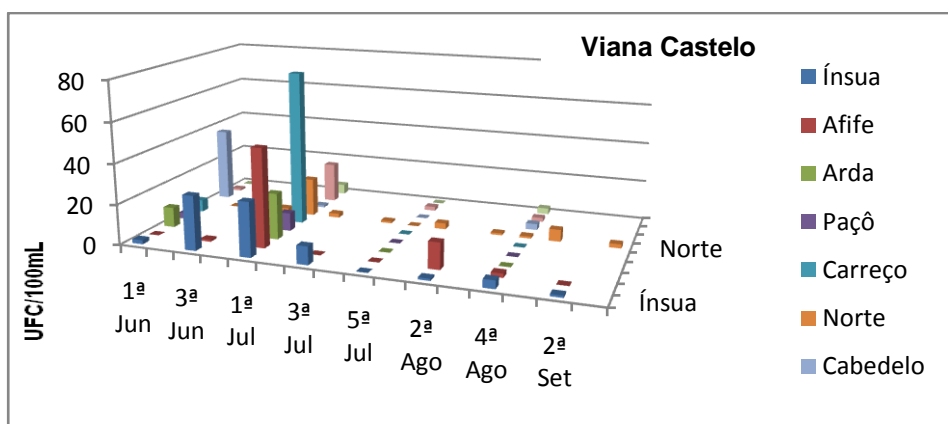


Figura 24. Resultados obtidos na quantificação de Enterococos, em amostras de águas balneares, no concelho de Viana do Castelo.

No concelho de Esposende, todas as praias tiveram muito poucas contagens, excepto a praia Suave Mar na segunda semana de Junho, com 260 UFC/100 mL, e a praia da Apúlia com 100 UFC/100 mL na primeira semana de Julho. As praias como Antas e Belinho tiveram contagens nulas na maioria das amostragens, bem como S. Bartolomeu do Mar (Figura 25).

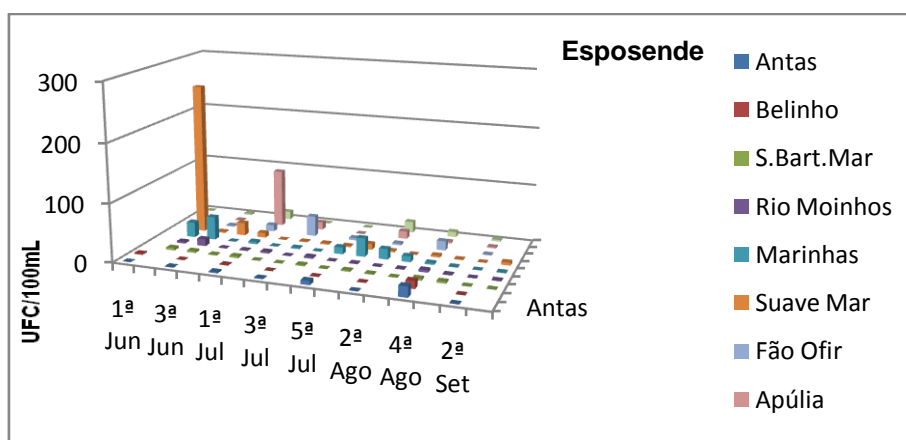


Figura 25. Resultados obtidos na quantificação de Enterococos, em amostras de águas balneares, no concelho de Esposende.

No concelho da Póvoa do Varzim, as contagens de Enterococos volta a aumentar, comparativamente com os concelhos mais a norte, nomeadamente nas praias de Zona Urbana Norte, Lagoa e Codixeira. Na praia de Quião denota-se uma contaminação ocasional das águas, na primeira semana de Agosto, à semelhança da quantificação de *E. coli*, para a mesma amostra (Figura 26).

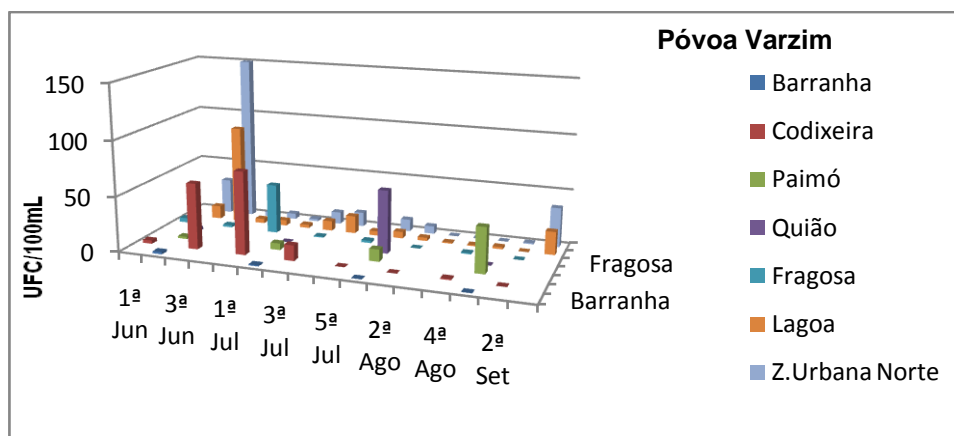


Figura 26. Resultados obtidos na quantificação de Enterococos, em amostras de águas balneares, no concelho da Póvoa do Varzim.

Relativamente ao concelho de Vila do Conde, a praia do Mindelo obteve sempre resultados entre as 12 UFC e as 290 UFC/100 mL, durante a época balnear. As praias de Frente Urbana Norte e Frente Urbana Sul obtiveram contagens significativas ao longo das amostragens. A praia Zona Urbana Norte teve sempre baixos resultados, comparativamente com as outras praias amostradas do concelho. A praia da Árvore estava interdita, pelo que, embora fizesse parte do plano de amostragem, não foram efectuadas análises (Figura 27).

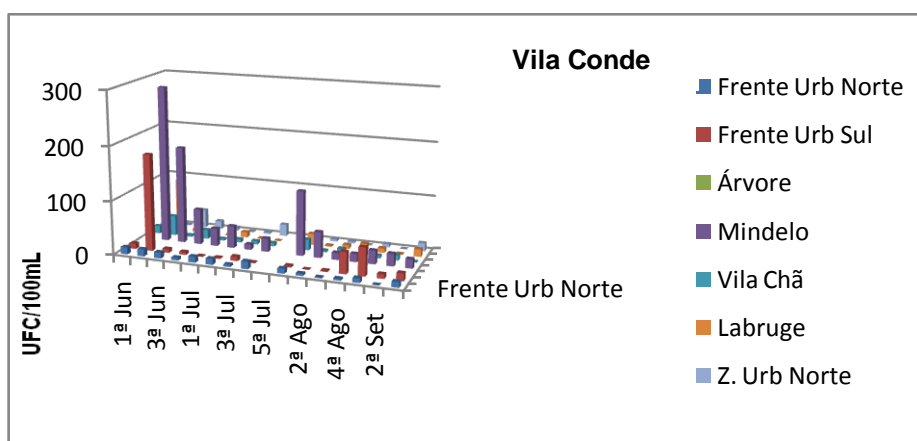


Figura 27. Resultados obtidos na quantificação de Enterococos, em amostras de águas balneares, no concelho de Vila do Conde.

Quanto ao concelho de Matosinhos, a praia de Matosinhos (a cor rosa) obteve um pico de contaminação por Enterococos de 950 UFC/100 mL, na segunda semana

de amostragem, mantendo baixos valores até ao final da época balnear. No entanto, nessa mesma semana todas as praias amostradas obtiveram resultados elevados. Na primeira semana de Julho também se obteve novamente resultados na praia da Agudela.

A praia da Memória e Leça da Palmeira são as praias do concelho com menor valores de *Enterococos* encontrados (Figura 28).

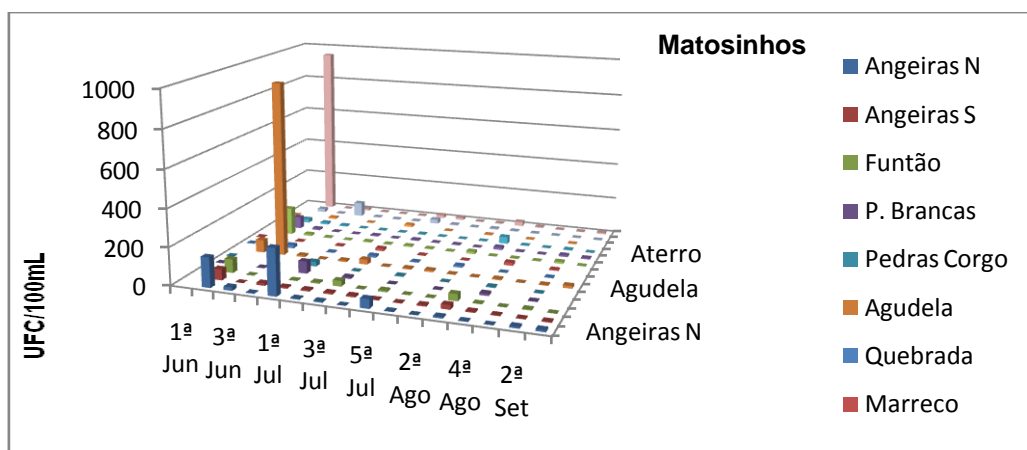


Figura 28. Resultados obtidos na quantificação de *Enterococos*, em amostras de águas balneares, no concelho de Matosinhos.

No concelho do Porto, à semelhança dos resultados de *E.coli*, a praia do Castelo do Queijo, é a praia que tem mais contagens, com um pico na segunda semana de Junho de 320 UFC/100 mL. As restantes praias, exceptuando Gondarém também na primeira semana de Junho, obtiveram baixas contagens de *Enterococos* ao longo da época balnear. A praia da Foz foi a que teve resultados mais baixos (Figura 29).

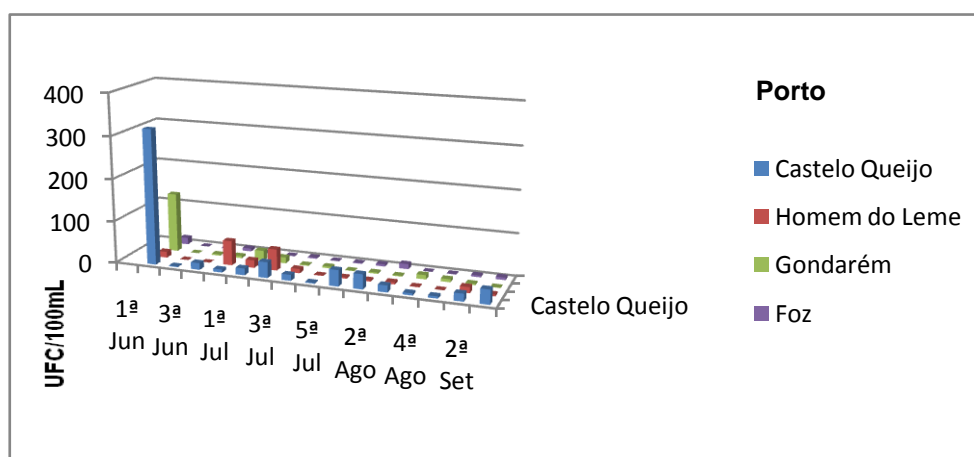


Figura 29. Resultados obtidos na quantificação de *Enterococos*, em amostras de águas balneares, no concelho do Porto.

Relativamente às praias do concelho de Vila Nova de Gaia, todas as amostragens durante a época balnear obtiveram resultados muito baixos ou nulos, excepto na segunda semana de Junho e primeira de Julho, bem como a praia de S. Félix da Marinha, que obteve uma contagem de 2100 UFC/ 100 mL de Enterococos ,na segunda semana de Junho (Figura 30).

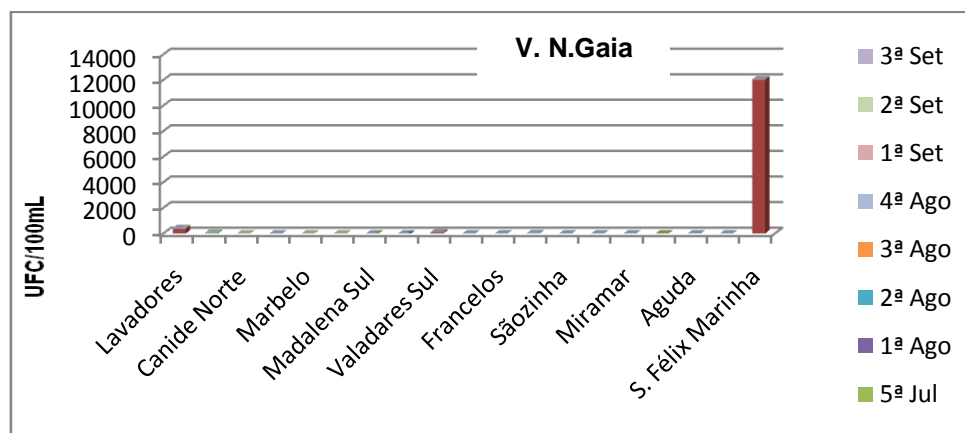


Figura 30. Resultados obtidos na quantificação de Enterococos, em amostras de águas balneares, no concelho de Vila Nova de Gaia.

Por fim, no concelho de Espinho, as praias com mais resultados de Enterococos foram as praias da Seca e Frente Azul, logo na primeira semana de Junho, baixando drasticamente os valores nas restantes amostras. Na praia Espinho – Baía, obteve-se um pico na primeira semana de Julho. A praia Frente Rua 37 obteve resultados nulos na maioria das amostragens, durante a época balnear (Figura 31).

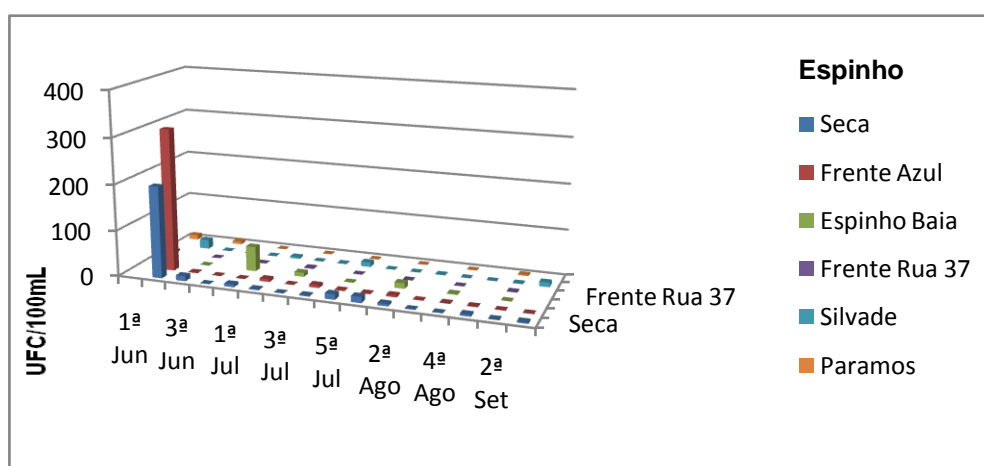


Figura 31. Resultados obtidos na quantificação de Enterococos, em amostras de águas balneares, no concelho de Espinho.

Mediante os resultados obtidos para a quantificação de *E.coli* e Enterococos, segundo a legislação aplicável, Decreto-Lei 135/2009 de 3 de Junho, as praias e correspondentes concelhos podem-se classificar de qualidade “Excelente”, “Boa” ou “Aceitável”. Nas praias em que se tenha obtido resultados superiores a esta classificação são consideradas com a classificação de “Má”, sendo interditada ao uso pela população.

Nos gráficos seguintes, encontram-se representados os concelhos *versus* qualidade da água ao longo da época balnear, para o parâmetro *E.coli* (Figura 32) e para o parâmetro Enterococos (Figura 33).

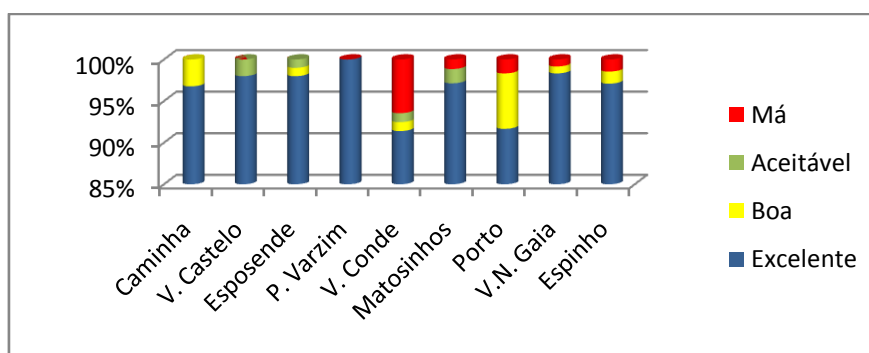


Figura 32. Qualidade das águas balneares nas praias, relacionadas com os concelhos, para o parâmetro *E. coli*, em percentagem.

Para o parâmetro *E. coli*, verificou-se que apenas o concelho da Póvoa do Varzim obteve a classificação de excelente em 100% das análises realizadas. Os restantes concelhos obtiveram resultados na ordem dos 90% de qualidade Excelente.

Realça-se que no concelho de Vila do Conde foi o local onde se encontrou maior percentagem de contaminação, nomeadamente 6% de praias classificadas como “Má”. Concretamente, estes resultados impróprios localizaram-se na praia da Árvore, sendo esta interditada ao fim de três resultados consecutivos fora dos limites.

Relativamente às análises realizadas para a quantificação de Enterococos, verificou-se que nos concelhos de Caminha, Viana do Castelo e Póvoa do Varzim se obteve a classificação de excelente em 100% das análises realizadas. Nos concelhos de Esposende, Vila do Conde, Matosinhos, Porto, Vila Nova de Gaia e Espinho, obtiveram resultados entre 96 a 99% de qualidade Excelente.

Nos concelhos de Vila do Conde, Porto e Vila Nova de Gaia, foram encontrados 2% de praias com a classificação de “Má”.

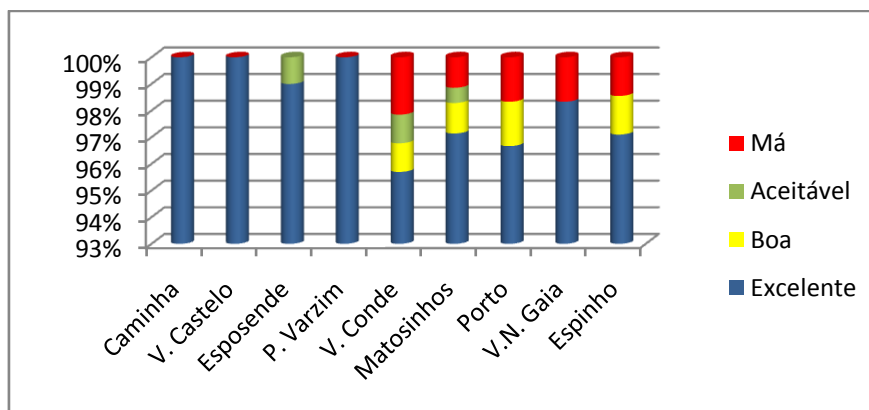


Figura 33. Qualidade das águas balneares nas praias, relacionadas com os concelhos, para o parâmetro Enterococos, em percentagem.

4.3. ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DAS AMOSTRAS DE ÁGUAS DO RIO AVE

As amostragens efectuadas nos quatro pontos de recolha relativos ao rio Ave, foram filtradas em meio de McConkey suplementado com MER, CTX e ATM, após o término da época balnear, na 2ª semana de Outubro.

Foram obtidas contagens nas várias filtrações tendo-se verificado uma maior percentagem de colónias características na marina de Vila do Conde e na Junqueira, no meio com ATM, como se encontra descrito na figura 34.

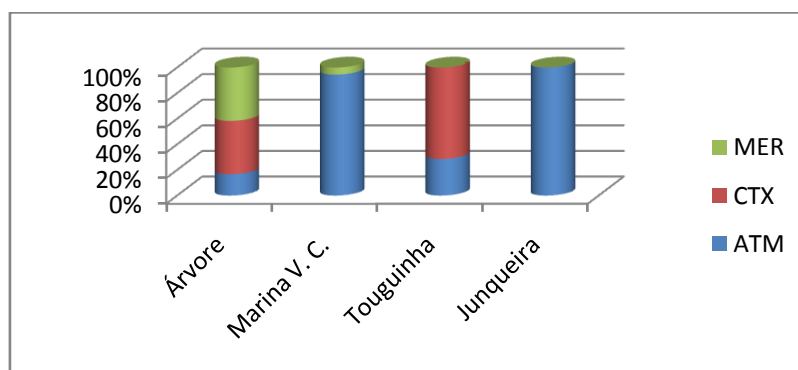


Figura 34. Contagens obtidas nas águas recolhidas no rio Ave, nos pontos de amostragem, Árvore, marina de Vila de Conde, Touguinha e Junqueira, para o parâmetro *E. coli*, no meio de cultura McConkey suplementado com antibiótico (MER, CTX, ATM).

4.4. ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DA AMOSTRA DE ÁGUA DA SERRA DA CABREIRA

Relativamente à amostra colhida na nascente do rio, obtiveram-se contagens de *E. coli* de 26 UFC/100 mL e Enterococos de 2 UFC/100 mL. De acordo com a legislação aplicável, DL 135/209 de 3 de Junho, considera-se de Qualidade Excelente.

4.5. ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DAS AMOSTRAS FEZES DE BOVINO E DO SOLO

Na amostra de fezes, o resultado obtido foi de 50 UFC/g, na diluição 10^{-1} , tanto em meio suplementado com CTX, como ATM.

Quanto à amostra de solo obteve-se contagens em todos os meios suplementados com antibióticos (CTX, ATM e MER).

4.5. ENSAIOS DE SUSCEPTIBILIDADE A AGENTES ANTIMICROBIANOS

Com a filtração inicial das amostras para meio selectivo e diferencial onde foram adicionadas concentrações conhecidas de cefotaxima, aztreonamo e meropenemo, foi possível obter colónias que, por crescerem em meio suplementado com antibiótico, foram evidenciadas resistências a esses mesmos antibióticos. Na tabela 13, relacionou-se as várias colónias resistentes encontradas nos diferentes meios, ao longo das amostragens de águas balneares costeiras efectuadas em todos os concelhos, das águas do rio Ave e da nascente deste.

Tabela 13. Quantificação do crescimento de bactérias coliformes em meio McConkey suplementado com ATM, CTX e MER.

Amostragem (semanas)	MC+Aztreonamo	MC+Cefotaxima	MC+Meropenemo	
	ATM	CTX	MER	Total
	(n=36)	(n=438)	(n=104)	(n=538)
4ª Julho Mar	1 (2,8%)	5 (1,1%)	0	6 (1,1%)
1ª Agosto Mar	0	128 (29,2%)	0	128 (23,8%)
2ª Agosto Mar	23 (63,9%)	51 (11,6%)	0	84 (15,6%)
3ª Agosto Mar	0	14 (3,2%)	0	14 (2,6 %)
4ª Agosto Mar	2 (5,6%)	3 (0,7%)	3 (2,9%)	8 (1,5%)
1ª Setembro Mar	1 (2,8%)	8 (1,8%)	0	9 (1,7%)
2ª Setembro Mar	1 (2,8%)	3 (0,7%)	0	4 (0,4%)
3ª Setembro Mar	0	1 (0,2%)	0	1 (0,2%)
2ª Outubro Rio	2 (5,6%)	210 (47,%)	101 (97,1%)	313 (58,2%)
2ª Outubro Nascente	6 (16,7%)	15 (3,4%)	0	21 (3,9%)

De acordo com os resultados obtidos, foi possível observar que, em meio com aztreonamo, o número de colónias que cresceram neste meio é bastante inferior ao encontrado nos dois outros meios (36 UFC), encontrando-se no entanto resistências na maioria das semanas de amostragem. O meio suplementado com cefotaxima foi o

meio em que se obteve maior contagem de colónias, obtendo-se resistências em todas as semanas de amostragem, principalmente nas amostras das águas de mar na primeira semana de Agosto, e na segunda semana de Outubro, nas amostras da água do rio. O meio com meropenemo teve na sua maioria valores nulos de crescimento, excepto nas amostras efectuadas no rio Ave.

Os ensaios de susceptibilidade permitiram determinar o comportamento dos isolados obtidos inicialmente, mediante a presença dos vários antimicrobianos em estudo, pelo método de difusão em agar, para serem posteriormente classificados como resistentes, intermédios e sensíveis, de acordo com as normas padrão do CLSI, 2009.

Assim, dos ensaios de susceptibilidade efectuados, obtiveram-se diferentes valores de resistência para os vários antibióticos estudados. No gráfico, figura 37, estão demonstradas as percentagens de resistências encontradas em todas os isolados em que se fez o respectivo antibiograma.

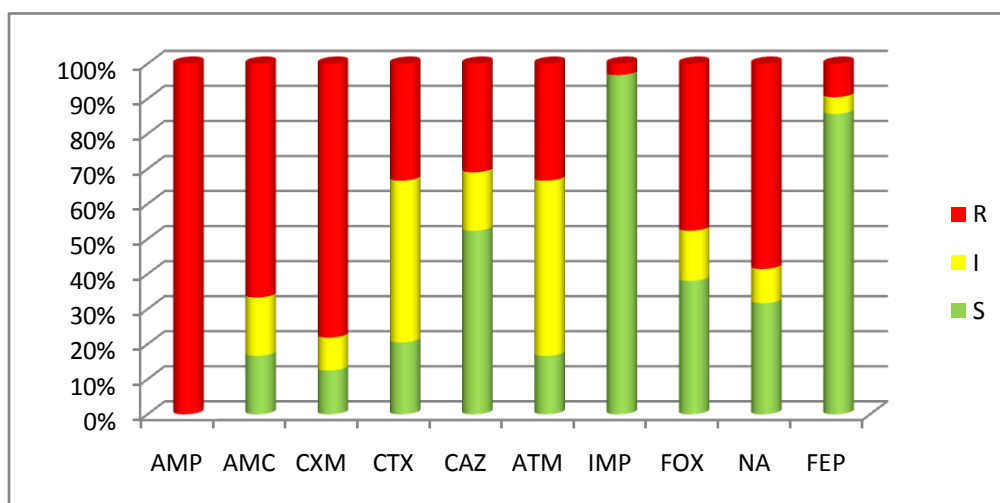


Figura 35. Perfil de susceptibilidade aos diferentes antibióticos, das estirpes isoladas, obtidas neste estudo, em percentagem.

Através da figura 37, pode-se verificar as resistências encontradas neste estudo. Para o antibiótico ampicilina, observou-se resistência em todos os isolados. A amoxicilina com ácido clavulânico apresenta 70% dos isolados com resistências, sendo equivalentes os isolados com resistência intermédia e sensíveis. Relativamente à cefuroxima, 80% do total de isolados com resistências, e os restantes 20% entre isolados sensíveis e com resistência intermédia.

Já a percentagem de isolados resistência a cefotaxima e aztreonamo são semelhantes, bem como nas resistências intermédias e isolados sensíveis. A ceftazidima apresenta maior número de isolados sensíveis, sendo apenas 30 % dos isolados resistentes a este antibiótico. Relativamente ao imipenemo, este é o antibiótico estudo que apresenta maior percentagem de isolados sensíveis, cerca de 95%, seguindo-se a cefepima, com 83% isolados sensíveis. Dos isolados estudados, nenhum apresentou resistência intermédia ao imipenemo. Por fim, a cefoxitina apresenta valores de resistência de 50% e o ácido nalidíxico de 60%.

De todos os antibiogramas realizados, foram encontrados em sete isolados, bactérias com produção de ESBL's. O perfil de resistência dos isolados de *E. coli* produtores de ESBL's, encontra-se descrito na tabela 14.

Tabela 14. Perfil de susceptibilidade dos isolados de interesse de *E. coli* e ponto isoelectrico das respectivas β -lactamases.

Antibiótico	Isolados						
	1	2	3	4	5	6	7
	AterroCT XD1	AterroAT MD1	Árv1AAT M	Árv1ACT X	Touguinh a3ACTX	M.S.ATM A1	Junqueir a4aATM
	Diam (mm)	Diam (mm)	Diam (mm)	Diam (mm)	Diam (mm)	Diam (mm)	Diam (mm)
AMP	6 (R)	6 (R)	6 (R)	6 (R)	6 (R)	6 (R)	6 (R)
AMC	10 (R)	11 (R)	12 (R)	15 (I)	17 (I)	15 (I)	15 (I)
CXM	6 (R)	6 (R)	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
CTX	10 (R)	12 (R)	12 (R)	8 (R)	N.D.	12 (R)	6 (R)
CAZ	21 (S)	21 (S)	15 (I)	18 (S)	20 (S)	19 (S)	13 (R)
ATM	15 (R)	12 (R)	21 (I)	17 (I)	18 (I)	15 (R)	12 (R)
IPM	26 (S)	27 (S)	N.D.	N.D.	N.D.	25 (S)	N.D.
FOX	23 (S)	23 (S)	25 (S)	24 (S)	23 (S)	22 (S)	19 (S)
NA	11 (R)	25 (S)	6 (R)	22 (S)	6 (R)	6 (R)	18 (I)
FEP	15 (I)	17 (I)	25 (S)	19 (S)	18 (S)	13 (R)	14 (R)
pl	9			5,4	9	5,4 + 9	

Em todos os antibiogramas foi possível observar total resistência à ampicilina e resistência à cefotaxima, na maioria dos isolados. Na associação da amoxicilina com o ácido clavulânico encontrou-se apenas resistências e resistência intermédia.

Todos os isolados encontrados demonstraram serem susceptíveis à acção da cefoxitina, e ao imipenemo, nos isolados em que se realizou o ensaio.

Na figura 38 é possível observar o sinergismo observado em certos antibiogramas, como no antibiograma isolado a partir de ARV.CTXA-1 1, bem como as resistências encontradas.

Nos antibiogramas obtidos foi possível visualizar notável sinergismo no isolado AterroCTXD1, AterroATMD1. Também se visualizou este fenómeno, no isolado Árv1AATM, Árv1ACTX, Touguinha3ACTX e M.S.ATMA1, como também no isolado Junqueira4aATM, embora com menos intensidade.

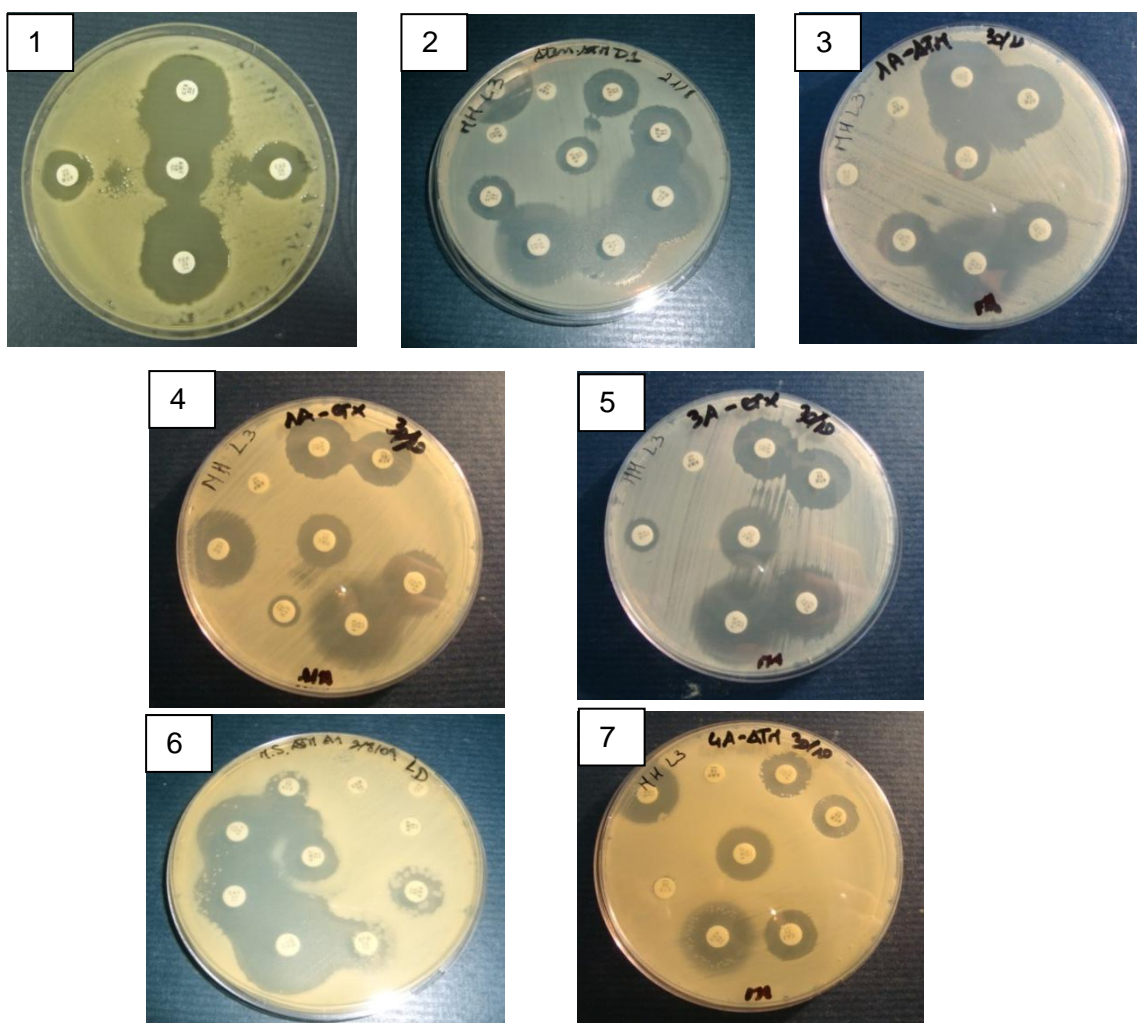


Figura 36. Antibiogramas obtidos pelo isolamento de bactérias a partir das amostras de água de mar. Legenda: 1. Árv.CTX A⁻¹ 1; 2. AterroATM D1; 3. Árv1A ATM; 4. Árv1A CTX; 5. Touguinha3A CTX; 6. M.S.ATMA1; 7. Juqueira4aATM

4.6.1. CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA PELO API 20E

Foram submetidos ao teste API os isolados Árv.CTX A-1 1, AterroATM D1, Árv1A ATM, Árv1A CTX, Touguinha3A CTX, M.S.ATMA1 e Juqueira4aATM.

Os resultados foram concordantes em todos os isolados obtidos, tendo sido identificada a espécie *Escherichia coli*.

4.7. TESTE DE SINERGISMO

Pelas semelhanças fenotípicas encontradas nos antibiogramas, foi realizado o teste de sinergismo, pelo método de duplo disco para se poder obter confirmação da presença de ESBL em determinados isolados. Foi adicionado o ácido clavulânico aos cinco isolados seguintes: V.Conde2B-ATM, VMATMVM1, C.Q.ATMA1, Junqueira4AATM e Árv1A CTX, os quais necessitavam de confirmação para a presença de ESBL. Os resultados estão expressos na tabela 15.

Tabela 15. Resultados do teste de sinergismo.

<i>Isolado</i>	<i>Antibiótico</i>	<i>Resultado (halo mm)</i>
V.Conde2B-ATM	CAZ	Não houve crescimento
VMATMVM1	CAZ	Não houve crescimento
C.Q.ATMA1	CTX	Não houve crescimento
Junqueira4AATM	CAZ	CAZ 16 mm / CAZ+Ác. Clav. 21mm
Árv1A CTX	ATM	CAZ 20 mm / CAZ+Ác. Clav. 25 mm

Assim, a presença de ESBL é confirmada pela diferença do halo dos dois discos. No caso do isolado Junqueira4AATM, o antibiótico testado foi a ceftazidima, que mostrou uma diferença para o halo de ceftazidima+ácido clavulânico superior a 5 mm, figura 31. No isolado Árv1A CTX, obteve-se uma variação do halo do disco aztreonamo igual a 5 mm, para o halo de aztreonamo + ácido clavulânico, figura 39. Ambos os isolados demonstraram presença de ESBL.

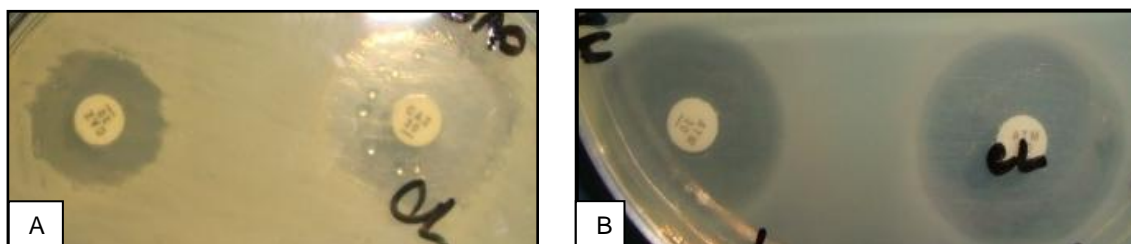


Figura 37. Resultados do teste de sinergismo: **A.** Junqueira4AATM e **B.** Árv1A CTX.

4.7. FOCAGEM ISOELÉCTRICA

O perfil das β -lactamases, encontradas nos isolados de *E.coli*, foi estudado por focagem isoelétrica.

A focagem isoelétrica dos extractos obtidos a partir dos isolados de *E. coli* produtoras de ESBL's, relevaram a presença de uma banda com um pI de >8 no isolado AterroCTXD1 e no isolado Touguinha3ACTX. Também mostraram a presença de outra banda com um pI de 5,4 relativo ao extracto do isolado Árv1ACTX e, por fim, a partir do extracto do isolado M.S.ATMA1 obtiveram-se duas bandas, um pI de 5,4+ >8. O gel obtido encontra-se evidenciado na figura 40.

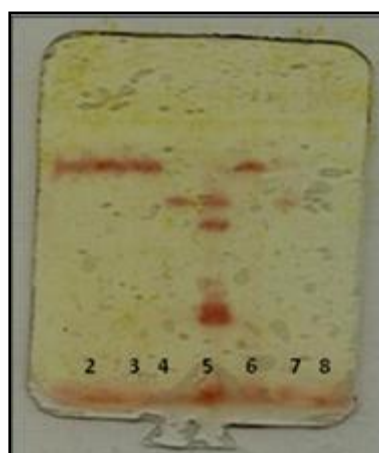


Figura 38. Gel resultante da focagem isoelétrica. Legenda (Posição poço/ n.º Isolado): **2.** AterroATMD1; **3.** Árv1AATM, **4.** Árv1A CTX; **5.** Padrão; **6.** Touguinha3ACTX; **7.** M.S.ATMA1; **8.** Junqueira4A ATM.

4.8. CONJUGAÇÃO

Realizou-se o ensaio de conjugação com a estirpe receptora *E.coli* K802N, nos isolados AterroATMD1, Árv1ACTX e Junqueira4AATM, a fim de se verificar a transferência de resistência à cefotaxima.

Nos isolados Árv1ACTX e Junqueira4AATM, não ocorreu conjugação, não tendo sido conseguida a transferência dos genes com a resistência ao antibiótico em estudo.

No isolado AterroATMD1, ocorreu conjugação, pois, no meio McConkey selectivo com CTX e NA, houve crescimento do transconjugante.

Foram realizados dois antibiogramas, com os transconjugantes de duas colónias (1i e 2i) AterroATMD1 e *E.coli* K802N. Obtiveram-se os seguintes halos (tabela 16):

Tabela 16. Perfis de susceptibilidade dos transconjugantes, AterroATMD1 1i e AterroATMD1 2i.

Antibiótico	Transconjugante do isolado	
	AterroATMD1 1i	AterroATMD1 2i
	Diam(mm)	Diam (mm)
Ampicilina AMP	6 (R)	6 (R)
Amoxicilina+Ác. Clav. AMC	17 (I)	16 (I)
Cefuroxima CXM	6 (R)	6 (R)
Cefotaxima CTX	13 (R) Si	6 (R) Si
Ceftazidima CAZ	18(S)	20 (S)
Aztreonamo ATM	17 (I)	17(I)
Imipenemo IPM	28 (S)	28 (S)
Cefoxitin FOX	24 (S)	24 (S)
Ác.Nalidíxico NA	6 (R)	6 (R)
Cefepime FEP	12 (R) Si	12 (R) Si

A partir dos antibiogramas é possível verificar a transferência das resistências, pela presença de resistência não só ao antibiótico cefotaxima, como também à ampicilina, cefuroxima e cefepime. A resistência ao ácido nalidíxico, era uma condição intrínseca da estirpe receptora *E. coli* K802N (figura 41).



Figura 39. Antibiograma obtido do transconjugante AterroATMD1 1i e *E. coli* K802N.

CAPÍTULO 5 – DISCUSSÃO

O presente trabalho incidiu sobre o estudo da qualidade das águas balneares das praias do litoral norte de Portugal, entre Caminha e Espinho, bem como sobre as resistências encontradas nessas amostras e em amostras de água do rio Ave, em localizações diferentes, tendo sido observadas resistências com interesse ambiental e social.

A qualidade das águas balneares foi avaliada pela quantificação de *E. coli* e Enterococos, espécies de referência neste tipo de análises.

O estudo da presença de *E.coli* teve elevada importância, pelo seu aparecimento em águas superficiais, ambiente com características diferentes das da flora intestinal. A sua prevalência como agente indicador de contaminação fecal em águas balneares, permite averiguar possíveis causas de contaminação das águas, considerando-se também importante por ser um organismo indicador dos níveis de resistência a antibióticos presentes na flora intestinal humana e em várias espécies de animais de produção.

Assim, verificou-se que na maioria das praias analisadas, a presença de *E. coli* esteve quase sempre abaixo das 250 UFC/100mL, com excepção das praias no concelho de Vila do Conde, em que se obtiveram valores sempre acima da média obtida nas restantes praias do norte do país, no mesmo período. A praia da Árvore e do Mindelo caracterizam-se por serem as praias com maiores contagens dando origem a todas as más classificações do concelho.

Relativamente à presença de enterococos, obteve-se resultados bastante inferiores à *E. coli*, apresentando valores entre 0-30 UFC/100 mL na maioria das praias. As excepções encontradas foram os valores pontuais elevados, como na praia Suave Mar, Esposende, na 2ª semana de Junho, eventualmente devido a uma descarga pontual de efluentes não tratados. À semelhança do parâmetro *E. coli*, também no concelho de Vila do Conde foram encontrados elevados valores de enterococos, principalmente em Mindelo e Árvore, denotando-se resultados inconstantes em todas as praias do concelho.

Em todas as análises efectuadas ao longo da costa norte portuguesa, a zona que se mais evidenciou, pela presença de elevada contaminação, foi sem dúvida o

concelho de Vila do Conde, motivo pelo qual a segunda parte do trabalho incidiu no estudo da origem da mesma, nomeadamente a influência do rio Ave, que desagua precisamente na zona próxima da praia com maiores valores de contaminação.

Assim, as análises às amostras em quatro pontos do rio Ave, demonstraram prevalência de bactérias resistentes a vários antibióticos. A amostra colhida na marina de Vila do Conde foi a que obteve maior crescimento, seguida da amostra colhida em Touguinha.

Com a realização dos testes de sensibilidade a antibióticos, conseguiu-se obter uma imagem geral sobre a resistência aos antimicrobianos dos isolados das águas balneares do norte de Portugal, nomeadamente em amostras da Árvore (Vila Conde) e Aterro (Matosinhos) e do rio. Pode-se verificar que se obteve uma prevalência de 100% de resistência em todos os isolados à ampicilina, 80% à cefuraxima, 70% à amoxicilina e ácido clavulânico. Relativamente ao ácido nalidíxico os valores de resistência são de 60% e 50% para a cefoxitina. Quanto à ceftazidima, 30% dos isolados encontrados apresentam resistência.

As principais susceptibilidades encontradas foram relativas ao imipenemo, 95%, e à cefepima, com 83%. Os resultados obtidos para o imipenemo estão de acordo com as características do próprio antibiótico, por ser um antibiótico de largo espectro, de última linha de uso exclusivamente hospitalar. No entanto, por ser um antibiótico com uso apenas hospitalar, o aparecimento de 1 (5%) isolado, M. S. ATM C2, oriundo da praia de Matosinhos Sul, com resistência a este antibiótico, poderá sugerir a disseminação de resistências a partir de efluentes hospitalares.

Relativamente ao antibiótico cefepima, os isolados que apresentaram elevado grau de resistência, foram amostras de Matosinhos Sul, marina de Vila do Conde e Junqueira.

Relativamente à classe de β -lactâmicos estudados, considera-se que, mesmo com a associação da amoxicilina com o ácido clavulânico, o número de resistências encontradas é significativo, bem como no caso da cefuroxima, uma cefalosporina de segunda geração, que em 32 isolados, apenas 4 eram sensíveis a este antibiótico. Quanto às cefalosporinas de terceira geração, obteve-se igual percentagem de isolados resistentes, 13 isolados resistentes à cefotaxima, e 13 isolados resistentes à ceftazidima, que, ao contrário da cefotaxima (8 isolados sensíveis), demonstrou 22 isolados sensíveis num total de 42.

Os resultados obtidos parecem estar de acordo com Witte, 2000, que refere o aparecimento de resistências em ambientes aquáticos, como águas de lagos (Witte 2000).

A partir dos antibiogramas obtidos, foi possível detectar a presença de enzimas β -lactamases de espectro alargado, responsáveis pela resistência a antibacterianos, como os oximino- β -lactâmicos. Assim, conforme Bradford 2001 referiu, também os nossos resultados as encontradas nos isolados Árv.CTX A⁻¹, AterroATM D1; Árv1A ATM, Árv1A CTX, Touguinha3A CTX, M.S.ATMA1 e Juqueira4A ATM, são motivos de grande preocupação pelo seu perfil de resistência, bem como pela sua rápida disseminação e ampla distribuição geográfica (Bradford 2001).

Adicionalmente, os ensaios de conjugação revelaram que os genes que conferem resistências à cefotaxima, cefuroxima, cefepime e ampicilina, podem ser transferíveis, pois foi obtido um transconjugante com estas características, em *E. coli* K802N, que apenas possuía resistência ao ácido nalidíxico, sendo sensível aos restantes antibióticos. Estes fenómenos sugerem que a disseminação da resistência a estes antibióticos pode ser promovida por vários factores presentes no meio ambiente, principalmente em locais como produções animais e hospitais, onde a quantidade de vectores de transmissão de resistências é de dimensões elevadas. O facto das principais classes moleculares das β -lactamases em *Enterobacteriaceae* serem codificadas por genes localizados em plasmídeos conjugativos, vai facilitar a disseminação da resistência aos β -lactâmicos, e promover a co-selecção em relação a outros antibióticos.

Também segundo Witte, 2000, as interacções entre diferentes sistemas de ecossistemas, e diferentes interacções entre hospedeiros, como os animais e os humanos, favorecem a transferência de resistências e de estirpes resistentes. As bactérias comensais assumem assim uma elevada importância pela sua pronunciada capacidade de aquisição e transferência de genes de resistência, como a *E. coli* ou *Enterococos* na flora intestinal. A transferência de resistências de animais para humanos a partir da alimentação/cadeia alimentar também está bem definida. Outras vias, como a água e vegetais são menos investigados, existindo no entanto evidências de transferência de genes de resistência em ambientes aquáticos.

Os principais reservatórios de resistências encontram-se em humanos e em animais pelo que, o vector de transmissão mais provável, é a flora intestinal.

Assim, para se poder inferir quanto à origem da contaminação e das percentagens elevadas de resistências encontradas, seria necessário uma maior amostragem das fezes de animais, provenientes das produções que estão localizadas ao longo das margens do rio Ave. Com o aumento de amostras, seria possível comparar a sua origem, se são provenientes de que tipo de produção, com o tipo de tratamento antibacteriano utilizado como profilaxia e terapêutica e consecutivamente com os tipos de antibióticos utilizados e quais as resistências existentes. A mesma situação seria necessária para se poder depreender sobre a importância das contaminações nos solos, e de que forma vão influenciar a água do rio.

CAPÍTULO 6 – CONSIDERAÇÕES FINAIS

Como considerações finais do presente trabalho, podemos referir que tanto as águas balneares costeiras, como as águas balneares interiores (de rio) em território português, poderão ser um reservatório de *E. coli* com resistência a várias classes de antibióticos de interesse clínico e veterinário, bem como de genes de resistência a essas mesmas classes, com elevada capacidade de disseminação entre os ecossistemas. Esta constatação sugere que as medidas adoptadas pela União Europeia, como remediação e controlo da disseminação de bactérias resistentes na Europa, tanto a nível clínico, como em produções animais, ainda não foram suficientes para eliminar totalmente a presença de estirpes resistentes no meio ambiente, principalmente em águas recreativas.

Globalmente podemos referir que maioria das praias do norte litoral de Portugal apresentaram qualidade “Excelente”, com excepção do concelho de Vila do Conde, onde se verificou uma praia de qualidade “Má”, tendo sido interdita para banhos.

Relativamente à avaliação do perfil de susceptibilidade de *E. coli*, foram encontradas resistências na maioria dos β -lactâmicos estudados, encontrando-se resistências à cefalosporina de quarta geração, cefepima, bem como a um antibiótico da classe dos carbapenemos, o imipenemo.

Foram encontradas β -lactamases de espectro alargado em sete isolados de *E. coli*. O facto de dois isolados produtores de β -lactamases de espectro alargado, terem origem na praia de Árvore, permite referir que estes podem estar directamente relacionados com os isolados encontrados em dois pontos a montante da foz do rio Ave, Touguinha e Junqueira, no mesmo período de amostragem.

Também foi possível confirmar a transferência dos genes codificadores de ESBL's, com ensaios de conjugação, no isolado AterroATMD1.

Não foi possível avaliar a hipótese destas resistências provirem dos terrenos agrícolas que utilizam as fezes dos animais como fertilizante, pelo facto do número de amostras ter sido diminuto.

Este trabalho permitiu um aumento do conhecimento da presença de resistências, nomeadamente de estirpes produtoras de β -lactamases de espectro alargado, em águas balneares costeiras e fluviais, além de um maior conhecimento da sua incidência e epidemiologia, em Portugal.

Com o desenvolvimento deste trabalho foi possível associar situações recorrentes e constantes que contribuem diariamente para a disseminação de bactérias resistentes, bem como a produção de ESBL's. Como principal factor encontra-se o uso excessivo de antibióticos, não só em medicina humana, como também, e principalmente, em veterinária, mas situações como infecções cruzadas em hospitais e a mobilidade de pacientes entre instituições de saúde vão permitir uma constante emergência de resistências. A tendência, cada vez maior, para se considerar o mundo como uma “aldeia global”, faz aumentar a migração humana, e as relações comerciais, principalmente da área alimentar, não permitindo um controlo total da problemática das resistências, pois existem sempre muitos factores associados, que são impossíveis de controlar e orientar.

BIBLIOGRAFIA

89/107/CEE, D. (21 de Dezembro de 1988). "Relativa à aproximação das legislações dos Estados-membros respeitantes aos aditivos que podem ser utilizados nos géneros destinados à alimentação humana." Jornal Oficial das Comunidades Europeias.

90/167/CEE, D. (26 de Março de 1990). "Relativo às condições de preparação e comercialização e utilização de alimentos medicamentosos em produções animais na Comunidade Europeia." Jornal Oficial das Comunidades Europeias.

96/23/CE, D. (29 de Abril de 1996). "Relativa às medidas de controlo a aplicar a certas substâncias e aos seus resíduos nos animais vivos e respectivos produtos e que revoga as Directivas 85/358/CEE e 86/469/CEE e as Decisões 89/187/CEE e 91/664/CEE." Jornal Oficial das Comunidades Europeias.

2003/534/CE, D. (17 de Julho de 2003). "Decisão da Comissão, de 17 de Julho de 2003, que altera a Decisão n.º 2119/98/CE do Parlamento Europeu e do Conselho e a Decisão 2000/96/CE no que diz respeito às doenças transmissíveis enumeradas naquelas decisões e que altera a Decisão 2002/253/CE no que diz respeito às definições de casos de doenças transmissíveis." Jornal Oficial da União Europeia.

2005/187/CE (2 de Março de 2005). Recomendação da Comissão relativa ao programa coordenado de controlo no domínio da alimentação animal para 2005, nos termos da Directiva 95/53/CE do Conselho. 2005/187/CE. J. O. d. U. Europeia.

52001DC0333 (20 de Junho de 2001). "Comunicação da Comissão relativa a uma estratégia de luta contra a resistência antimicrobiana." Jornal Oficial da União Europeia.

Aarestrup, F. M. (1999). "Association between the consumption of antimicrobial agents in animal husbandry and the occurrence of resistant bacteria among food animals." International Journal of Antimicrobial Agents **12**: 279-285.

Aarestrup, F. M. (2000). "Occurrence, selection and spread of resistance to antimicrobial agents used for growth promotion for food animals in Denmark." APMIS Suppl. **101**: 1-48.

Aarestrup, F. M. W., H. C.; Collignon, P. (2008). "Resistance in bacteria of the food chain: Epidemiology and control strategies." Expert Review of Anti-Infective Therapy **6**: 733-750.

Alcaide, E. G., E. (1984). "R-plasmid transfer in *Salmonella* spp. isolated from wastewater and sewage-contaminated surface waters." Applied and Environmental Microbiology **48**(2): 435-438.

Ambler, R. P. (1980). "The structure of β -lactamases." Philosophical Transactions Royal Society London B, Biological Sciences **289**(1036): 321-331.

Baharoglu, Z. B., D.; Mazel, D. (2010). "Conjugative DNA transfer induces the bacterial SOS response and promotes antibiotic resistance development through integron activation." PLoS Genet. **6**(10): e1001165.

Bailey, J. E. e. O., D.F. (1986). Biochemical Engineering Fundamentals. Singapore, McGraw-Hill Book Co.

Baquero, F. M., J.L.; Cantón, R. (2008). "Antibiotics and antibiotic resistance in water environments." Current Opinion in Biotechnology **19**(3): 260-265.

Barbosa, T. M. a. L., S. B. (2000). "The impact of antibiotic use on resistance development and persistence." Drug Resistance Updates. **3**: 303-311.

- Barreto, A. G., B.; Radhouani, H.; Araújo, C.; Gonçalves, A.; Gaspar, E.; Rodrigues, J.; Igrejas, G.; Poeta, P. (2009). "Detection of antibiotic resistant *E. coli* and *Enterococcus* spp. in stool of healthy growing children in Portugal." Journal of Basic Microbiology **49**: 1-10.
- Bebrone, C. (2007). "Metallo-beta-lactamases (classification, activity, genetic organization, structure, zinc coordination) and their superfamily." Biochemical Pharmacology **74**(12): 1686-1701.
- Biyela, P. T. L., J.; Bezuidenhout, C. C. (2004). "The role of aquatic ecosystems as reservoirs of antibiotic resistant bacteria and antibiotic resistance genes." Water Science and Technology **50**(1): 45-50.
- Bohnert, J. B., Hubner B., Botzenhart K. (2000). "Rapid identification of *Enterobacteriaceae* using a novel 23S rRNA-targeted oligonucleotide probe." International Journal of Hygiene Environmental Health(203): 77-82.
- Bolton, N. F. C., N. J.; Hallsworth, P.; Fallowfield, H. J. (2010). "A review of the factors affecting sunlight inactivation of micro-organisms in waste stabilisation ponds: preliminary results for enterococci." Water Science and Technology **61**(4): 885-890.
- Bonilla, T. D. N., K.; Cuvelier, M.; Hartz, A.; Green, M.; Esiobu, N.; McCorquodale, D. S.; Fleisher, J. M.; Rogerson, A. (2007). "Prevalence and distribution of fecal indicator organisms in South Florida beach sand and preliminary assessment of health effects associated with beach sand exposure." Marine Pollution Bulletin **54**(9): 1472-1482.
- Bonnet, R. (2004). "Growing Group of Extended-Spectrum β -Lactamases: the CTX-M Enzymes." Antimicrobial Agents and Chemotherapy **48**: 1-14.
- Bradford, P. A. (2001). "Extended-spectrum β -lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat." Clinical Microbiology Review **14**: 933-951.
- Buddington, R. (2003). "Postnatal changes in bacterial populations in the gastrointestinal tract of dogs." American Journal of Veterinary Research **64**(5): 646-651.
- Bush, K., G.A. Jacoby, and A.A. Medeiros (1995). "A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure." Antimicrobial Agents and Chemotherapy **39**: 1211-1233.
- Bush, K. J., G. (1997). "Nomenclature of TEM β -lactamases. ." Journal of Antimicrobial Chemotherapy **39**: 1-3.
- Bush, K. J., G.A. (2010). "Updated functional classification of beta-lactamases." Antimicrobial Agents and Chemotherapy **54**(3): 969-976.
- Cabral, P. (2010). "Water Microbiology. Bacterial Pathogens and Water." International Journal of Environmental Research and Public Health **7**: 3657-3703.
- Cantón, R. C., T. M. (2006). "The CTX-M beta-lactamase pandemic. ." Current Opinion in Microbiology **9**: 466-475.
- Chee-Sanford, J. C. A., R. I.; Krapac, I. J.; Jeanjean, N. G.; Mackie, R. I. (2001). "Occurrence and Diversity of Tetracycline Resistance Genes in Lagoons and Groundwater Underlying Two Swine Production Facilities." Applied and Environmental Microbiology **67**(4): 1494-1502.
- Chigor, V. N. U., V.J.; Smith, S.I.; Igbinosa, E.O.; Okoh, Al. (2010). "Multidrug resistance and plasmid patterns of *Escherichia coli* O157 and other *E. coli* Isolated from diarrhoeal stools and surface waters from some selected sources in Zaria, Nigeria." International Journal of Environmental Research and Public Health **7**(10): 3831-3841.

- Chroma, M. K., M. (2010). "Genetic methods for detection of antibiotic resistance: focus on extended-spectrum β -lactamases." Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub **154**(4): 289-296.
- Clermont, O. B., S.; Bingen, E. (2000). "Rapid and Simple Determination of the Escherichia coli Phylogenetic Group." Applied and Environmental Microbiology **66**(10): 4555-4558.
- Clinical and Laboratory Standards Institute, C. (2009). "Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard - Tenth Edition." **M02-A10 29**(1).
- Cohen, F. L. T., D. (1997). "Microbial resistance to drug therapy: a review." American Journal of Infection Control **25**(1): 51-64.
- Cohen, M. L. (1994). "Antimicrobial resistance: prognosis for public health." Trends in Microbiology **24**: 422-425.
- Costa, D. P., P.; Sáenz, Y.; Vinué, L.; Coelho, A. C.; Matos, M.; Rojo-Bezares, B.; Rodrigues, J.; Torres, C. (2008). "Mechanisms of Antibiotic Resistance in Escherichia coli Isolates Recovered from Wild Animals. ." Microbial Drug Resistance. **14**: 71-77.
- Cricco, J. A. V., A. J. (1999). "Class B beta-lactamases: the importance of being metallic." Current Pharmaceutical Design **5**(11): 915-927.
- D'Aoust, J. Y. (1994). "Salmonella and the international food trade." International Journal of Food Microbiology **24**: 11-31.
- DANMAP (2006). "Use of Antimicrobial Agents and Occurrence of Antimicrobial Resistance in Bacteria from Food Animals, Food and Humans in Denmark."
- DANMAP (2010). "Use of Antimicrobial Agents and Occurrence of Antimicrobial Resistance in Bacteria from Food Animals, Food and Humans in Denmark."
- Dibner, J. J. R., J. D. (2005). "Antibiotic Growth Promoters in Agriculture: History and Mode of Action." Poultry Science **84**: 634-643.
- Ding, C. H., J. (2010). "Effect of antibiotics in the environment on microbial populations." Applied Microbiology and Biotechnology **87**(3): 925-941.
- DL135/2009 Decreto-Lei 135/2009 de 3 de Junho.
- Doyle, M. P. Z., T.; Zhao, S. (1997). *Escherichia coli* 0157:H7. Food Microbiology, Fundamentals and Frontiers. L. R. B. Doyle M. P., T. J. Montville. Washington D.C., ASM Press: 171-191.
- Duriez, P. e. a. (2001). "Commensal Escherichia coli isolates are phylogenetically distributed among geographically distinct human populations." Microbiology **147**: 1671-1676.
- Dzidic, S. B., V. (2003). "Horizontal gene transfer-emerging multidrug resistance in hospital bacteria." Acta Pharmacol Sin. **24**(6): 519-526.
- Eisenstein, B. I. a. S., D. (2003). Bases Biológicas de acção antibacteriana. Rio Janeiro, Guanabara Koogan.
- Ercis, S. S., B.; Kocagöz, T.; Kocagöz, S.; Hasçelik, G.; Bolmström, A. (2007). "Rapid 4 to 6 hour detection of extended-spectrum beta-lactamases in a routine laboratory." Scandinavian Journal of Infectious Diseases **39**(9): 781-785.

- Essack, S. Y. H., L. M. C.; Pillary, D. G.; McFadyen, M. L.; Livermore, D. (2001). "Complexity and diversity of *Klebsiella pneumoniae* strains with extended-spectrum beta-lactamase isolated in 1994-1996 at a teaching hospital in Durban, South Africa." Antimicrobial Agents and Chemotherapy **45**: 88-95.
- Fàbrega, A. S.-C. S., S.; Vila, J. (2008). "Quinolone resistance in the food chain." International Journal of Antimicrobial Agents **31**: 307-315.
- Facklam, R. R. C., M. D. (1989). "Identification of *Enterococcus* species isolated from human infections by a conventional test scheme." Journal of Clinical Microbiology **27**(4): 731-734.
- FDA, F. a. D. A. (2003). Evaluating the safety of antimicrobial new drugs with regard to their microbiological effects on bacteria of human health concern. Guidance for Industry #152 Rockville, MD.
- Fernandes, A. J. R. d. F., P. T.; Pinto, A. B. (2010). "Antimicrobial resistance of heterotrophic marine bacteria isolated from seawater and sands of recreational beaches with different organic pollution levels in southeastern Brazil: evidences of resistance dissemination." Environmental Monitoring and Assessment **169**(1-4): 375-384.
- Fernandes, R. G., A.; Freitas, J. M.; Santos, P.; Prudêncio, C. (2009). "High resistance to fourth-generation cephalosporins among clinical isolates of enterobacteriaceae producing extended-spectrum β -lactamases isolated in Portugal." International Journal of Antimicrobial Agents **33**: 184-185.
- Garau, G. G., D. (2005). "Structure-Based Phylogeny of the Metallo- β -Lactamases." Antimicrobial Agents and Chemotherapy **49**(7): 2778-2784.
- Gniadowski, M. (2008). "Evolution of extended-spectrum β -lactamases by mutation." Clinical Microbiology and Infection **14**: 11-32.
- Goñi-Urriza, M. C., M.; Arpin, C.; Raymond, N.; Caumette, P.; Quentin, C. (2000). "Impact of an urban effluent on antibiotic resistance of riverine Enterobacteriaceae and *Aeromonas* spp." Applied and Environmental Microbiology **66**(1): 125-132.
- Guerrant, R. L. V. G., T.; Steiner, T.S.; Thielman, N.M.; Slutsker, L.; Tauxe, R.V.; Hennessy, T.; Griffin, P.M.; DuPont, H., Sack, R.B.; Tarr, P.; Neill, M.; Nachamkin, I.; Reller, L.B.; Osterholm, M.T.; Bennish, M.L.; Pickering, L.K. (2001). "Practice guidelines for the management of infectious diarrhea." Infectious Diseases Society of America(CID 2001:32).
- Harold, C. T., D. (1996). Antimicrobial Chemotherapy. Medical Microbiology. B. S. Galveston, University of Texas Medical Branch at Galveston.
- Heiling, S. L., P.; Breslow, L. (2002). "Curtailling antibiotic use in agriculture." West J Med **176**(1): 9-11.
- Henriques, I. S. F., F.; Alves, A.; Saavedra, M.J.; Correia, A. (2006). "Occurrence and diversity of integrons and β -lactamase genes among ampicillin-resistant isolates from estuarine waters." Research in Microbiology **157**: 938-947.
- Herzer, P. J. I., S.; Inouye, M.; Whittam, T.S. (1990). "Phylogenetic distribution of branched RNA-linked multicopy single-stranded DNA among natural isolates of *Escherichia coli*." Journal of Bacteriology **172**(11): 6175-6181.
- Holms, H. (1996). "Flux analysis and control of the central metabolic pathways in *Escherichia coli*." FEMS Microbiology Reviews **19** (2): 85-116.
- Huyghebaert, G. D., R.; Immerseel, F. (2011). "An update on alternatives to antimicrobial growth promoters for broilers." The Veterinary Journal **187**(2): 182-188.

- Ibekwe, A. M. M., S.E.; Graves, A.K. (2011). "Genetic Diversity and Antimicrobial Resistance of *Escherichia coli* from Human and Animal Sources Uncovers Multiple Resistances from Human Sources." PLoS One **6**(6): e20819.
- IRARn.º5/2005 (2005). Recomendação IRAR n.º5/2005 - Método alternativo para análise de bactérias coliformes e *Escherichia coli*.
- ISO5667-9 (1992). "Water Quality - Sampling: Guidance on sampling from marine water."
- ISO7899-2 (2000). Water quality - Detection and enumeration of intestinal enterococci. Part 2: Membrane filtration method.
- ISO9308-1:2000 (2000). Water Quality- Detection and enumeration of *Escherichia coli* and coliform bacteria. Part. 1, International Standard.
- ISO19458 (2006). "Water Quality - Sampling for microbiological analysis."
- ISO/TS11133-2:2003/Amd1 (2011). "Guidelines on preparation and production of culture media -- Part 2: Practical guidelines on performance testing of culture media."
- Jacoby, G. (2006). "β-lactamase nomenclature." Antimicrobial Agents and Chemotherapy **50**(4): 1123-1129.
- Jacoby, G. A., and Munoz-Price, L.S. (2005). "The new β-lactamases. ." New England Journal of Medicine **352**: 380-391.
- Jarlier, V. N., M.; Fournier, G.; Philippon, A. (1988). "Extended broad spectrum beta-lactamases conferring transferable resistance to newer beta-lactam agents in *Enterobacteriaceae*: hospital prevalence and susceptibility patterns." Rev. Infect. Dis. **10**: 867-878.
- Jones, J. G. (1986). "Antibiotic resistance in aquatic bacteria." Journal of Antimicrobial Chemotherapy **Suppl C**: 149-154.
- Kanj, S. S. K., Z.A. (2011). "Current concepts in antimicrobial therapy against resistant gram-negative organisms: extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae*, carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*, and multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*." Mayo Clin Proc. **86**(3): 250-259.
- Kapil, A. (2005). "The challenge of antibiotic resistance: Need to contemplate." Indian Journal of Medical Research. **121**: 83-91.
- Klein, G. (2003). "Taxonomy, ecology and antibiotic resistance of enterococci from food and the gastro-intestinal tract." International Journal of Food Microbiology **88**(2-3): 123-131.
- Knothe, H. S., P.; Krcmery, V.; Antal, M.; Mitsuashi, S. (1983). "Transferable resistance to cefotaxime, ceftiofur, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*." Infection **11**: 315-317.
- Kümmerer, K. (2004). "Resistance in the environment. ." J Antimicrob Chemother. **54**: 311-320.
- Lagacé-Wiens, P. B., P.; Pang, P.;Hammond, G. (2010). "First Description of an Extended-Spectrum-Beta-Lactamase-Producing Multidrug-Resistant *Escherichia fergusonii* strain in a patient with cystitis." American Society for Microbiology **48**(6): 2301-2302.
- Lederberg, J. T., E. L. (1946). "Gene recombination in *Escherichia coli*." Nature **158**(4016): 558-558.
- Lei 58/2005, n. (2005). Lei n.º 58/2005. DR 249 Série I-A de 2005-12-29.

- Livermore, D. (2004). "Can better prescribing turn the tide of resistance?" Nature Reviews Microbiol. **2**(1): 73-78.
- Livermore, D. M. (1995). "β-Lactamases in laboratory and clinical resistance." Clinical Microbiology **8**: 557-584.
- Macedo, A. S. F., A.R.; Abreu, C.; Machado, E.; Peixe, L.; Sousa, J.C.; Novais, C. (2011). "Characterization of antibiotic resistant enterococci isolated from untreated waters for human consumption in Portugal." International Journal of Food Microbiology **145**(1): 315-319.
- Marín, M. G., F. (2003). "Antibióticos betalactámicos." Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica **21**(1): 42-55.
- Martínez-Antonio, A., Salgado, H., Gama-Castro, S., Gutierrez-Rios, R.M., Jimenez-Jacinto, V. e and J. Collado-Vides (2003). "Environmental conditions and transcriptional regulation in *Escherichia coli*: A physiological integrative approach." Biotechnology and Bioengineering(84 (7)): 743-749.
- Martínez, J. (2008). "Antibiotics and Antibiotic Resistance Genes in Natural Environments." Science. **321**(5887): 365-367
- Massova, I. M., S. (1999). "Structural and mechanistic aspects of evolution of beta-lactamases and penicillin-binding proteins." Current Pharmaceutical Design **5**(11): 929-937.
- Mathew, e. a. (2007). "Antibiotic Resistance in Bacteria Associated with Food Animals: A United States Perspective of Livestock Production." Foodborne pathogens and disease **Vol. 4, Number 2**.
- Mendonça, N. L., J.; Manageiro, V.; Ferreira, E.; The Antimicrobial Resistance Surveillance Program in Portugal e Caniça, M. (2007). "Spread of Extended-Spectrum β-Lactamase CTX-M-Producing *Escherichia coli* Clinical Isolates in Community and Nosocomial Environments in Portugal." Antimicrobial Agents and Chemotherapy **51**: 1946-1955.
- Mudryk, Z. J. (2005). "Occurrence and distribution antibiotic resistance of heterotrophic bacteria isolated from a marine beach." Marine Pollution Bulletin **50**(1): 80-86.
- Munir, M. X., I. (2011). "Levels of antibiotic resistance genes in manure, biosolids, and fertilized soil." Journal of Antimicrobial Chemotherapy **40**(1): 248-255.
- Murray, B. (1998). "Diversity among multidrug-resistant enterococci." Emerging Infectious Diseases **4**(1): 37-47.
- Neidhardt, F. C., Ingraham, J. L. e Schaechter, M., Ed. (1990). Physiology of the bacterial cell - a molecular approach, Sinauer Associates, Sunderland, USA.
- Neill, M. A., Tarr P. I., Taylor D. N., Wolf M. (2001). *Escherichia coli*. Foodborne Disease Handbook. P. M. D. a. G. J. R. Hui Y. H. New York, Markel Dekker: 169-212.
- Nicolas-Chanoine, M. H. (1996). "Impact of beta-lactamases on the clinical use of beta-lactam antibiotics." International Journal of Antimicrobial Agents **7**(Suppl 1): S21-26.
- Novais, C. C., T.M.; Costa, M.J.; Sousa, J.C.; Baquero, F.; Peixe L.V. (2005). "High occurrence and persistence of antibiotic-resistant enterococci in poultry food samples in Portugal." Journal of Antimicrobial Chemotherapy **56**(6): 1139-1143.
- Pérez, F. E., A.; Hujer, K. M.; Bonomo, R. A. (2007). "The continuing challenge of ESBL's. ." Current Opinion in Pharmacology **7**: 459-469.
- Philippon, A. R., G.; Jacoby, G. A. (2002). "Plasmid-Determined AmpC-Type beta-lactamases." Antimicrobial Agents and Chemotherapy **46**(1): 1-11.

- Prescott, L. H., J.; Klein, D. (1996). Antimicrobial Chemotherapy. Microbiology, Third Edition I. McGraw-Hill Companies, Wm.C. Brown Publishers: 655- 675.
- Rasmussen, B. A. B., K. (1997). "Carbapenem-Hydrolyzing beta-lactamases." Antimicrobial Agents and Chemotherapy **41**(2): 223-232.
- Schwarz, S. C.-D., E. (2001). "Use of antimicrobials in veterinary medicine and mechanisms of resistance." Vet. Res. **32**: 201-225.
- Sinton, L. W. H., C. H.; Lynch, P. A.; Davies-Colley, R. J. (2002). "Sunlight inactivation of fecal indicator bacteria and bacteriophages from waste stabilization pond effluent in fresh and saline waters." Applied and Environmental Microbiology **68**(3): 1122-1131.
- Skurnik, D. R., R.; Andremont, A.; Amorin, C.; Rouquet, P.; Picard, B.; Denamur, E. (2006). "Effect of human vicinity on antimicrobial resistance and integrons in animal faecal *Escherichia coli*." Journal of Antimicrobial Chemotherapy **57**(6): 1215-1219.
- Slutsker, L. R., A.A.; Greene, K.D.; Wells, J.G.; Hutwagner, L.; Griffin, P.M. (1997). "Escherichia coli O157:H7 diarrhea in the United States: clinical and epidemiologic features." Ann Intern Med **126**: 505-513.
- Smith, J. T. L., C. S. (1993). "Mechanisms of antimicrobial resistance and implications for epidemiology." Veterinary Microbiology **35**: 233-242.
- SNIRH (2011). "Sistema Nacional de Informação de Recursos Hídricos." 2011.
- Snyder, J. W. M., G. K.; Johson, C. L. (2008). "Direct Comparison of the BD Phoenix System with the MicroScan WalkAway System for Identification and Antimicrobial Susceptibility Testing of *Enterobacteriaceae* and Nonfermentative Gram-Negative Organisms." Journal of Clinical Microbiology **46**: 2327-2333.
- Sousa, J. C. (2005). Manual de Antibióticos Antibacterianos. Porto, Edições Universidade Fernando Pessoa.
- Sousa, J. C. F., W. (2000). Microbiologia, vol. 2, LIDEL - Edições Técnicas, Lda.
- Sousa, J. C. F., Wanda F. (1998). Microbiologia, vol. 1, LIDEL - Edições Técnicas, Lda.
- Steinfeld, H. (2004). "The livestock revolution - a global veterinary mission." Veterinary Parasitology - Elsevier **125**: 19-41.
- Stepanuskas, R. G., T.C.; Jagoe, C.H.; Tuckfield, R.C.; Lindell, A.H.; McArthur, J.V. (2005). "Elevated microbial tolerance to metals and antibiotics in metal-contaminated industrial environments." Environmental Science & Technology **39**(10): 3671-3678.
- Teuber, M. (1999). "Spread of antibiotic resistance with food-borne pathogens." Cellular and Molecular Life Sciences **56**(755-763).
- Thiercelin, E. (1899). "Sur un diplocoque saprophyte de l'intestin susceptible de devenir pathogene." C. R. Soc. Biol. **51**: 269-271.
- Wegener, H. (2010). "Danish initiatives to improve the safety of meat products." Meat Science - Elsevier **84**: 276-283.
- WHO, W. H. O. (1996). The World Health Report 1996: Fighting disease, fostering development. **137**. Geneva.

WHOa. (2011). Step-by-step approach for development and implementation of hospital antibiotic policy and standard treatment guidelines. World Health Organization. New Delhi, India.

WHOb. (2011). Tackling antibiotic resistance from a food safety perspective in Europe. NLM Classification: QV 350. W. H. Organization. Copenhagen, Denmark.

Williams, J. D. (1999). " β -lactamases and β -lactamase inhibitors." International Journal of Antimicrobial Agents **12**: 3-7.

Witte, W. (2000). "Ecological impact of antibiotic use in animals on different complex microflora: environment." Int J Antimicrob Agents **14**: 321-325.


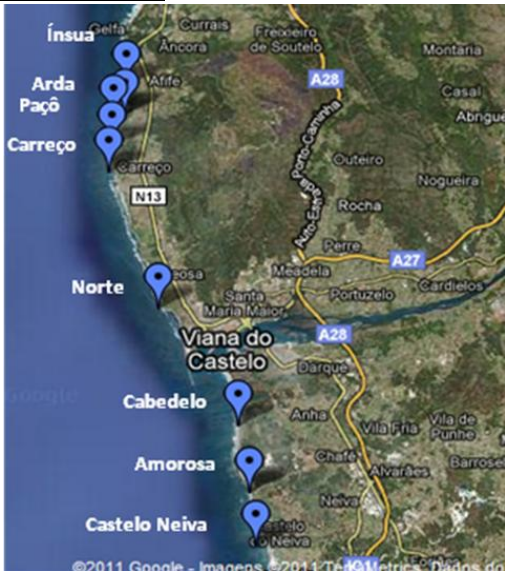
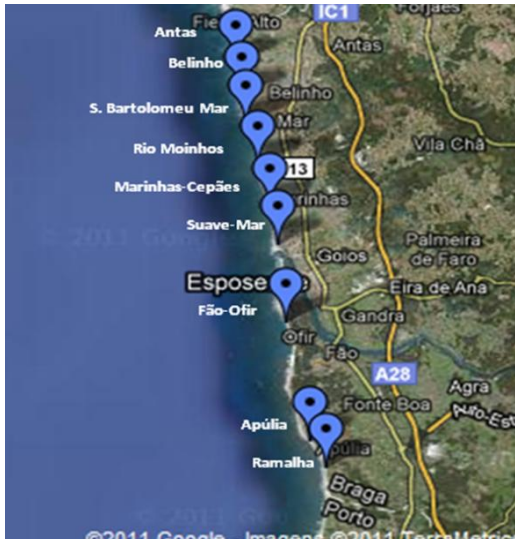
Yao, J. D. C. M., R. C. (1995). Antibacterial agents. Washington, DC, Am. Soc. Microbiology.

Young, H. K. (1993). "Antimicrobial resistance spread in aquatic environments." Journal of Antimicrobial Chemotherapy **31**(5): 627-635.

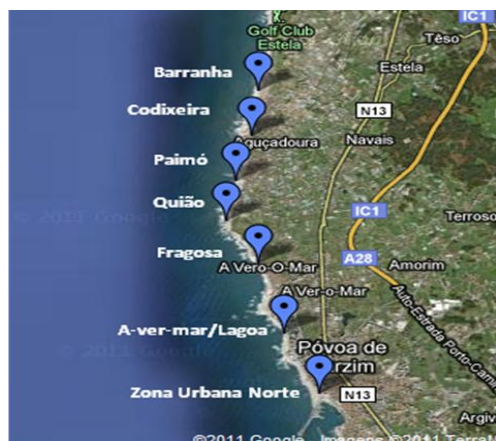
Zhu, X. W., J. D.; Solo-Gabriele, H. M.; Fleming, L. E. (2011). "A water quality modeling study of non-point sources at recreational marine beaches." Water Research **45**(9): 2985-2995.

ANEXO I

Localização dos concelhos e das praias amostradas.

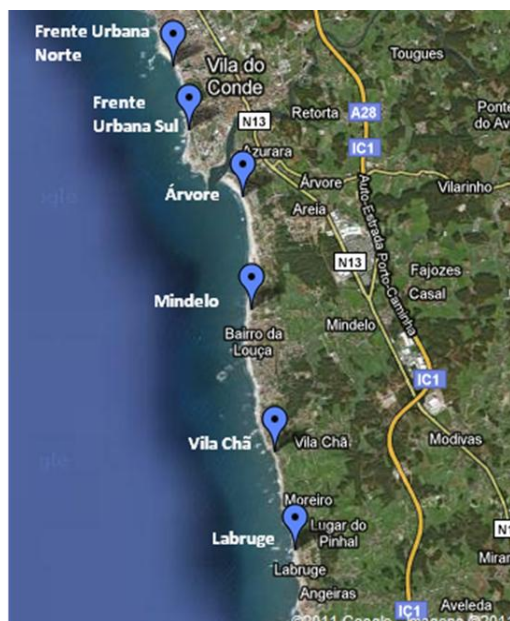
CONCELHO	PRAIA
<u>Caminha</u> 	Caminha Moledo Vila Praia Âncora Forte do Cão
<u>Viana do Castelo</u> 	Ínsua Afife Arda Paçô Carreço Norte Cabedelo Amorosa Castelo do Neiva
<u>Esposende</u> 	Antas Belinho S. Bartolomeu do Mar Rio Moinhos Marinhãs-Cepães Suave-Mar Fão-Ofir Apúlia Ramalha

Póvoa Varzim



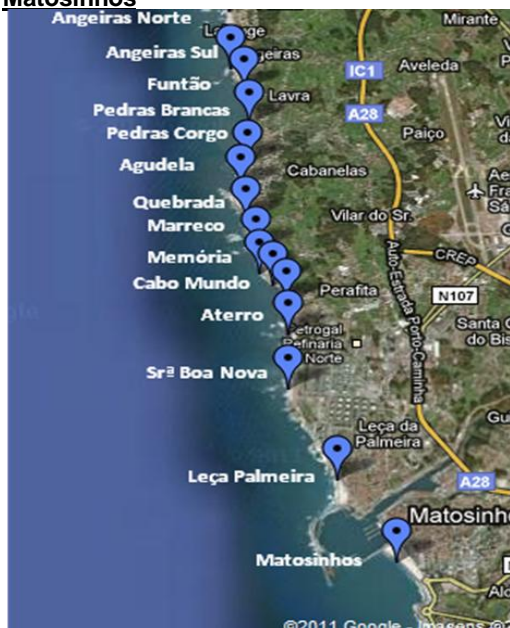
Codixeira
Paimó
Quião
Fragosa
A-ver-o-mar Sul
Zona Urbana Norte

Vila Conde



Frente Urbana Norte
Frente Urbana Sul
Árvore
Mindelo
Vila Chã
Labruge

Matosinhos



Angeiras Norte
Angeiras Sul
Funtão
Pedras Brancas
Pedras do Corgo
Agudela
Quebrada
Marreco
Memória
Cabo do Mundo
Aterro
Senhora Boa Nova
Leça Palmeira
Matosinhos

Porto

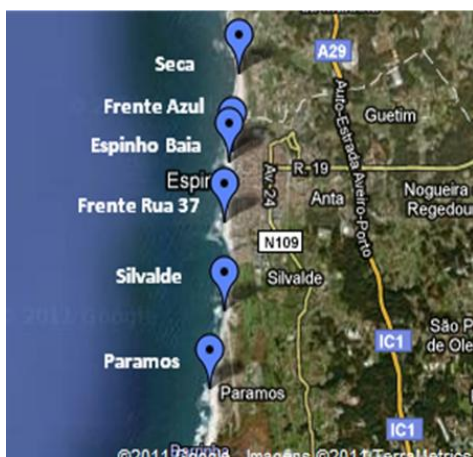


Vila Nova de Gaia



Castelo Queijo
Homem do Leme
Gondarém
Foz

Lavadores
Salgueiros
Canide Norte
Canide Sul
Marbelo
Madalena Norte
Madalena Sul
Valadares Norte
Valadares Sul
Dunas Mar
Francelos
Francemar
Sãozinha
Sr. Da Pedra
Miramar
Mar e Sol
Aguda
Granja
S. Félix Marinha

Espinho

Seca
Frente Azul
Baia
Frente Rua 37
Silvalde
Paramos

Localização dos concelhos e das praias amostradas.

ANEXO II

Perfil de susceptibilidade a diferentes antibióticos das estirpes isoladas, obtidas neste estudo. Legenda: ■ Resistente; ■ Intermédia; ■ Sensível.

Isolado	AMP	AMC	CXM	CTX	CAZ	ATM	IMP	FOX	NA	FEP
ARV.CTX A-1 1	6	20	14	22	14	10	27	16	15	21
ANGNMERA1	6	11	6	20	25	18	28	6	8	28
H.L.ATM A1	6	24	6	26	24	23	-	22	-	27
M.S.ATM A1	6	15	6	11	20	12	26	20	6	14
Agudela ATMA1	6	19	12	30	30	25	30	17	13	25
C.Q.ATM A1	6	11	14	24	25	19	26	15	22	21
GOND.ATM A1	11	10	20	16	15	13	-	9	16	28
ARV.ATM A1	6	7	6	15	24	13	32	6	11	22
Funtao CTX A1	6	7	6	15	16	15	29	6	11	22
ANG.NCTX A1	6	7	7	13	9	17	21	7	6	25
F.U.S.CTX B1	6	6	11	18	13	19	22	6	21	28
Agudela CTX B1	6	6	6	16	21	20	25	6	6	23
ANG.N.CTX.B1	6	26	14	22	28	6	32	24	8	28
MAT.CTX.B1	8	14	10	24	26	28	26	6	22	30
H.L.CTX B1	6	14	6	23	30	20	36	6	18	25
C.Q.CTX B1	6	6	6	17	21	18	30	6	7	26
ANG.N.CTX B1	6	6	18	24	16	18	22	8	6	34
Aterro ATM C1	13	21	19	18	19	17	23	15	22	23
ARVCTX.C2	6	6	9	15	8	17	22	28	6	24
ARV. ATMC2	6	6	7	18	15	18	23	8	6	26
ARV.ATM C1	6	6	12	20	18	20	19	12	9	21
ARV.CTX C1	6	13	15	17	12	12	25	15	6	19
MAT S. ATM C2	11	19	19	26	30	23	6	21	30	24
ARV.CTX D2	6	17	15	18	19	34	30	22	6	28
ARV.CTX.D3	7	9	7	21	26	23	21	22	26	27
AterroCTX D1	6	10	6	10	21	15	26	23	11	15
H.L.CTX D1	6	6	6	6	6	8	21	6	11	22
AterroATMD1	6	11	6	12	21	12	27	23	25	17
C.Q.CTX D1	6	7	16	20	25	27	25	6	6	34
F.U.N.CTX D1	6	6	9	12	12	18	23	6	24	26
FOZ MER D1	6	7	6	16	20	18	23	6	9	22
ARV CTX H1	6	6	6	18	6	18	24	6	6	23
1A-ATM	6	12	-	12	15	21	-	25	6	25
2A-ATM	6	18	-	13	12	12	-	20	22	23
2B-ATM	6	8	-	6	9	8	-	21	6	12
3A-ATM	6	6	-	14	16	23	-	9	21	32
4A-ATM	6	15	-	6	13	12	-	19	18	14
1A-CTX	6	15	-	8	18	17	-	24	22	19
2B-CTX	6	6	-	-	15	20	-	19	6	23
3A-CTX	6	17	-	-	20	18	-	23	6	18
3B-CTX	6	6	-	-	14	19	-	6	22	24
VM ATM VM1	8	7	-	9	7	7	30	13	20	9

ANEXO III

Resultados *E. coli* por UFC/100mL, obtidos nas praias durante as amostragens da época balnear, por concelhos.

CAMINHA Praias	1ª Jun	2ª Jun	3ª Jun	4ª Jun	1ª Jul	2ª Jul	3ª Jul	4ª Jul	5ª Jul	1ª Ago	2ª Ago	3ª Ago	4ª Ago	1ª Set	2ª Set	3ª Set
Caminha	0		4		1		2		0		0		1		2	
Moledo	0		12		1		5		0		47		0		4	
VP Ancora		280		57	1	25		23	33	6		69	23	96		49
Forte Cão		5				0				0				1		

VIANA CASTELO Praias	1ª Jun	2ª Jun	3ª Jun	4ª Jun	1ª Jul	2ª Jul	3ª Jul	4ª Jul	5ª Jul	1ª Ago	2ª Ago	3ª Ago	4ª Ago	1ª Set	2ª Set	3ª Set
Ínsua	1		2		4		4		0		4		1		2	
Afife	10		0		9				0				0			
Arda	26				20				0				0			
Paçô	3				6				0				2			
Carreço	70				2				0				1			
Norte		5		0	2	3		8	0	9		7	63	9		18
Cabedelo	590				1				1				0			
Amorosa	4				16				0				2			
Cast Neiva	1				2				0				1			

ESPOSENDE Praias	1ª Jun	2ª Jun	3ª Jun	4ª Jun	1ª Jul	2ª Jul	3ª Jul	4ª Jul	5ª Jul	1ª Ago	2ª Ago	3ª Ago	4ª Ago	1ª Set	2ª Set	3ª Set
Antas	0		2		0		1		0		0		5		10	
Belinho	2		0		0		0		0		1		1		1	
S.Bart.Mar		37	10	1	13	0	0	4	0	15	0	3	0	3	0	1

Rio Moinhos		90	1	0	0	0	0	98	2	2	0	96	10	0	0	0
Marinhas		270	1	1	1	0	2	2	0	10	1	38	4	1	0	3
Suave Mar		2800	0	67	68	0	0	8	0	29	0	60	6	6	0	8
Fão Ofir	10		0		0		5		12		11		0		4	
Apúlia	0		0		4		4		5		7		5		0	
Ramalha	10		0		0		0		5		25		96		0	

Póvoa Varzim Praias	1ª Jun	2ª Jun	3ª Jun	4ª Jun	1ª Jul	2ª Jul	3ª Jul	4ª Jul	5ª Jul	1ª Ago	2ª Ago	3ª Ago	4ª Ago	1ª Set	2ª Set	3ª Set
Barranha		13				1				1				0		
Codixeira	1		0		7		0		0		0		11		0	
Paimó		18				13				0				1		
Quião		11				1				26				210		
Fragosa	1		2		11		0		0		0		10		0	
Lagoa		55	0	4	7	1	7	84	5	8	1	6	4	10	0	77
Z.Urbana Norte		96	2	9	1	0	3	100	1	74	34	3	15	17	2	25

Vila Conde Praias	1ª Jun	2ª Jun	3ª Jun	4ª Jun	1ª Jul	2ª Jul	3ª Jul	4ª Jul	5ª Jul	1ª Ago	2ª Ago	3ª Ago	4ª Ago	1ª Set	2ª Set	3ª Set
Frente Urb Norte	59	42	9	2	6	12	145	2		35	15	2	15	2	0	20
Frente Urb Sul	140	15	1	1	31	49	100	2		29	7	6	31	7	60	36
Árvore		550	860	160												
Mindelo	220	0	53	89	16	1500	370	35		940	1000	150	260	55	120	78
Vila Chã	7	3	2	0	4	6	14	1		41	19	130	10	14	3	24
Labruge	10	2	17	2	1	46	0	0		35	5	45	78	13	2	60
Z. Urb Norte	55	42	9	2	7	4	1	0		430	10	2	13	4	0	23

Matosinhos Praias	1ª Jun	2ª Jun	3ª Jun	4ª Jun	1ª Jul	2ª Jul	3ª Jul	4ª Jul	5ª Jul	1ª Ago	2ª Ago	3ª Ago	4ª Ago	1ª Set	2ª Set	3ª Set
Angeiras N		360	120	0	1800	47	100	13	90	34	10	42	5	1	1	3
Angeiras S		460	53	3	10	2	230	15	10	2	5	30	46	4	0	2
Funtão		250	23	0	7	7	5	13	31	0	0	56	7	1	0	1
P. Brancas	0		14		180		0		31		0		6		0	
Pedras Corgo	1		1		39		5		3		1		3		7	
Agudela		290	0	1	0	0	20	2	33	10	5	26	3	3	4	84
Quebrada	1		0		2		2		0		1		6		0	
Marreco	2		4		0		2		0		8		8		1	
Memória		470	4	0	2	100	5	0	7	0	2	0	2	1	0	1
Cabo Mundo		210	0	0	0	2	7	26	3	12	0	18	1	10	0	6
Aterro		31	0	13	0	4	1	7	3	0	0	93	0	16	1	2
Srª Boa Nova	1		1		0		6		8		5		1		1	
Leça Palmeira		31	61	74	29	70	14	42	19	3	2	7	16	20	0	0
Matosinhos		900	2	9	21	1	6	77	78	9	2	60	3	27	9	21

Porto Praias	1ª Jun	2ª Jun	3ª Jun	4ª Jun	1ª Jul	2ª Jul	3ª Jul	4ª Jul	5ª Jul	1ª Ago	2ª Ago	3ª Ago	4ª Ago	1ª Set	2ª Set	3ª Set
Castelo Queijo		550	0	30	13	90	32	130	10	30	220	390	15	260	70	360
Homem do Leme		68	0	2	13	6	30	18	10	4	7	57	21	44	0	5
Gondarém		290	0	15	24	19	14	5	37	1	2	28	4	84	20	10
Foz		53	0	0	25	4	3	31	24	2	0	16	6	44	19	27

V. N. GAIA Praias	1ª Jun	2ª Jun	3ª Jun	4ª Jun	1ª Jul	2ª Jul	3ª Jul	4ª Jul	5ª Jul	1ª Ago	2ª Ago	3ª Ago	4ª Ago	1ª Set	2ª Set	3ª Set
Lavadores		780	3	0	190	9	10	30	21	6	4	32	2	17	19	0

Salgueiros	0		0		10		13		7		56		6		1	
Canide Norte	0		1		3		8		16		0		2		17	
Canide Sul	0		0		4		0		14		2		30		0	
Marbelo	2		2		1		1		21		0		1		0	
Madalena Norte	0		6		0		4		4		4		2			
Madalena Sul	0				0				1				7			
Valadares Norte	1				3				4				0			
Valadares Sul		220		0	3	2		15	9	1		0	1	8		46
Dunas Mar	2				4				60				3			
Francelos	2				0				3				5			
Francemar	0				14				13				21			
Sãozinha	2				7				1				10			
Sr. Pedra	0				12				4				1			
Miramar	1				1				1				2			
Mar e Sol	1				0				0				0			
Aguda	8				1				0				3			
Granja					4				60				2			
S. Félix Marinha		21000		2	0	56		46	20	21		0	2	15		13

ESPINHO Praias	1ª Jun	2ª Jun	3ª Jun	4ª Jun	1ª Jul	2ª Jul	3ª Jul	4ª Jul	5ª Jul	1ª Ago	2ª Ago	3ª Ago	4ª Ago	1ª Set	2ª Set	3ª Set
Seca		450	30	1	3	27	2	11	30	33	55	6	3	39	10	0
Frente Azul		800	30	1	1	10	0	4	4	45	10	12	0	1	4	2
Espinho Baía	18		0		62		26		10		36		3		0	
Frente Rua 37	2		4		2		0		0		0		0		12	
Silvade		0	3	0	0	23	1	30	60	12	0	18	0	6	0	17
Paramos	0		30		4		2		13		1		1		7	

Resultados de **Enterococos** por UFC/100mL, obtidos nas praias durante as amostragens da época balnear, por concelhos.

CAMINHA Praias	1ª Jun	2ª Jun	3ª Jun	4ª Jun	1ª Jul	2ª Jul	3ª Jul	4ª Jul	5ª Jul	1ª Ago	2ª Ago	3ª Ago	4ª Ago	1ª Set	2ª Set	3ª Set
Caminha	1		2		1		31		0		0		0		0	
Moledo	0		5		9		5		2		28		10		1	
VP Ancora		23		31	0	2		8	10	3		5	1	47		4
Forte Cão		0				0				1				4		

VIANA CASTELO Praias	1ª Jun	2ª Jun	3ª Jun	4ª Jun	1ª Jul	2ª Jul	3ª Jul	4ª Jul	5ª Jul	1ª Ago	2ª Ago	3ª Ago	4ª Ago	1ª Set	2ª Set	3ª Set
Ínsua	2		27		27		9		0		1		4		1	
Afife	0		1		49		0		0		13		2		0	
Arda	10				23				0				0			
Paçô	3				9				0				0			
Carreço	6				77				0				0			
Norte		0		2	19	2		1	0	3		1	1	6		2
Cabedelo	37				1				0				3			
Amorosa	1				20				2				2			
Cast Neiva	0				5				0				3			

ESPOSENDE Praias	1ª Jun	2ª Jun	3ª Jun	4ª Jun	1ª Jul	2ª Jul	3ª Jul	4ª Jul	5ª Jul	1ª Ago	2ª Ago	3ª Ago	4ª Ago	1ª Set	2ª Set	3ª Set
Antas	0		1		2		1		7		0		18		0	
Belinho	2		0		1		0		0		0		13		0	
S.Bart.Mar		4	3	1	3	0	0	2	0	2	1	0	3	3	0	0
Rio Moinhos		3	12	0	1	3	0	3	0	1	0	1	4	1	0	1

Marinhas		26	40	0	4	0	2	0	12	32	18	10	3	1	0	1
Suave Mar		260	2	22	8	0	1	2	2	10	2	0	3	1	0	5
Fão Ofir	0		2		11		35		4		3		16		1	
Apúlia	0		1		100		13		0		13		3		2	
Ramalha	0		2		14		0		0		19		9		3	

PÓVOA VARZIM Praias	1ª Jun	2ª Jun	3ª Jun	4ª Jun	1ª Jul	2ª Jul	3ª Jul	4ª Jul	5ª Jul	1ª Ago	2ª Ago	3ª Ago	4ª Ago	1ª Set	2ª Set	3ª Set
Barranha		2				1				0				0		
Codixeira	3		60		75		14		0		0		1		0	
Paimó		2				6				11				41		
Quião		3				0				57				0		
Fragosa	4		2		45		1		2		0		1		0	
Lagoa		12	90	4	5	3	9	16	4	6	3	1	1	2	0	21
Z.Urbana Norte		32	150	4	5	2	11	13	11	11	7	0	0	0	1	36

VILA CONDE Praias	1ª Jun	2ª Jun	3ª Jun	4ª Jun	1ª Jul	2ª Jul	3ª Jul	4ª Jul	5ª Jul	1ª Ago	2ª Ago	3ª Ago	4ª Ago	1ª Set	2ª Set	3ª Set
Frente Urb Norte	13	13	11	5	11	11	4	14		9	4	1	3	8	0	10
Frente Urb Sul	10	180	7	5	1	2	8	1		3	0	2	40	52	8	14
Árvore		290	180	66												
Mindelo	12	290	180	66	33	41	10	25		120	48	13	15	25	23	17
Vila Chã	14	37	3	17	3	6	6	6		20	3	10	1	5	10	1
Labruge	6	100	5	1	0	10	1	0		21	2	7	13	8	1	14
Z. Urb Norte	15	1	34	15	6	1	3	22		6	4	3	0	6	0	15

MATOSINHOS Praias	1ª Jun	2ª Jun	3ª Jun	4ª Jun	1ª Jul	2ª Jul	3ª Jul	4ª Jul	5ª Jul	1ª Ago	2ª Ago	3ª Ago	4ª Ago	1ª Set	2ª Set	3ª Set
Angeiras N		160	19	2	250	5	6	0	50	3	0	8	2	0	9	10
Angeiras S		59	0	13	7	8	8	8	3	2	7	24	6	3	2	4
Funtão		73	0	12	2	7	30	0	9	0	0	37	2	0	5	0
P. Brancas	0		2		65		9		0		0		12		2	
Pedras Corgo	1		0		25		0		5		0		5		1	
Agudela		68	940	9	0	8	27	1	6	10	2	1	6	0	4	14
Quebrada	1		17		3		11		3		10		0		2	
Marreco	3		2		3		14		2		0		17		5	
Memória		150	9	2	0	4	2	6	3	0	13	0	1	0	10	0
Cabo Mundo		65	8	1	0	5	0	5	1	3	0	14	1	0	9	6
Aterro		20	10	5	0	1	0	3	0	0	0	38	1	0	4	0
Srª Boa Nova	0		8		0		12		0		3		0		1	
Leça Palmeira		18	1	78	2	1	2	23	4	1	5	3	1	0	0	0
Matosinhos		950	0	10	1	1	2	17	13	1	3	24	5	1	2	8

PORTO Praias	1ª Jun	2ª Jun	3ª Jun	4ª Jun	1ª Jul	2ª Jul	3ª Jul	4ª Jul	5ª Jul	1ª Ago	2ª Ago	3ª Ago	4ª Ago	1ª Set	2ª Set	3ª Set
Castelo Queijo		320	2	16	7	16	37	14	2	38	35	16	5	5	18	34
Homem do Leme		14	0	0	58	18	50	10	1	3	3	5	1	0	14	4
Gondarém		140	0	3	5	24	14	2	4	1	3	2	10	7	3	1
Foz		16	0	1	7	1	1	3	1	2	5	12	0	1	4	6

V. N. GAIA Praias	1ª Jun	2ª Jun	3ª Jun	4ª Jun	1ª Jul	2ª Jul	3ª Jul	4ª Jul	5ª Jul	1ª Ago	2ª Ago	3ª Ago	4ª Ago	1ª Set	2ª Set	3ª Set
Lavadores		350	2	3	25	4	2	2	1	0	0	1	2	40	1	0
Salgueiros	0		0		2		5		3		60		1		0	

Canide Norte	3		0		5		0		1		0		0		4	
Canide Sul	0		0		0		0		3		0		4		0	
Marbelo	1		0		2		2		0		0		0		0	
Madalena Norte	1		0		2		2		0		0		0		1	
Madalena Sul	1				0				1				0			
Valadares Norte	0				1				0				0			
Valadares Sul		69		5	3	0		0	4	0		0	0	3		7
Dunas Mar	1				1				2				4			
Francelos	1				0				4				1			
Francemar	1				5				19				10			
Sãozinha	0				4				3				2			
Sr. Pedra	0				1				11				0			
Miramar	0				0				6				0			
Mar e Sol	4				0				3				0			
Aguda	6				0				5				7			
Granja					0				9				1			
S. Félix Marinha		12000		2	0	19		11	5	2		1	8	2		10

ESPINHO Praias	1ª Jun	2ª Jun	3ª Jun	4ª Jun	1ª Jul	2ª Jul	3ª Jul	4ª Jul	5ª Jul	1ª Ago	2ª Ago	3ª Ago	4ª Ago	1ª Set	2ª Set	3ª Set
Seca		200	11	0	6	2	0	2	12	13	5	0	0	4	1	3
Frente Azul		310	1	0	0	6	0	6	1	1	4	0	1	1	0	0
Espinho Baia	8		0		54		9		0		12		2		0	
Frente Rua 37	4		0		0		2		0		0		0		1	
Silvade		20	0	0	0	4	0	1	10	0	0	1	0	0	1	10
Paramos	10		6		0		0		0		0		0		2	